

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**LORENA MARTINS XAVIER**

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL DE CEPAS DE *Saccharomyces  
cerevisiae* LABORATORIAIS E SELVAGENS EM  
DIFERENTES ESTRESSES POR FERRAMENTAS  
DE BIOINFORMÁTICA**

**VITÓRIA - ES**

**2015**

Lorena Martins Xavier

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL DE CEPAS DE *Saccharomyces  
cerevisiae* LABORATORIAIS E SELVAGENS EM  
DIFERENTES ESTRESSES POR FERRAMENTAS  
DE BIOINFORMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr A.Alberto R. Fernandes

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia M. B. Fernandes

Vitória - ES

2015

Lorena Martins Xavier

**Análise do perfil de expressão gênica diferencial de  
cepas de *Saccharomyces cerevisiae* laboratoriais e  
selvagens em diferentes estresses por ferramentas de  
bioinformática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 03 de Abril de 2015

Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia M. B. Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Interno

Prof. Dr. Rogério Lopes Brandão  
Universidade Federal de Ouro Preto  
Membro externo

VITÓRIA  
2015

“Acima de tudo guarde o seu coração,  
pois dele depende todo o seu ser.”

Provérbios 4: 23

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus primeiramente, pois sem Ele não teria chegado até aqui.

À professora Dr<sup>a</sup> Patricia Machado Bueno Fernandes, que abriu as portas do laboratório coordenado por ela para que a pesquisa fosse realizada, e também pelo tempo despendido para discussão do trabalho, tanto em oportunidades com o grupo todo como em particular.

Ao meu orientador, Prof Dr. A. Alberto R. Fernandes pelo auxílio no trabalho e as discussões em grupo para o crescimento do trabalho e meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia ao Agronegócio por contribuírem cientificamente com meu trabalho e pelo convívio nestes anos de trabalho, em especial a Dr<sup>a</sup> Fernanda Bravim pelo incentivo e disponibilidade de tempo para auxiliar na construção do trabalho.

Ao auxílio que me prestaram Mainã, Jean, Raquel, Jefferson, Társio, Anuar, Jimmy, Eduardo, Olga e Astrid para a produção desse trabalho, pois às vezes é necessário descontrair para que a mente descanse e depois possamos voltar ao trabalho com mais afinco.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de crescimento durante as aulas com professores especializados nos assuntos ministrados.

À CAPES pelo auxílio com bolsa de pesquisa para que o trabalho fosse desenvolvido nesses dois anos.

Às agências de apoio e financiamento FINEP, CNPq, CAPES e FAPES que possibilitaram a produção desse projeto e tantos outros em nosso laboratório.

À minha família, pai, mãe e irmão, que sempre me ajudou e apoiou em meus estudos, e por sempre possibilitarem a minha total dedicação.

Aos amigos que entendiam as minhas ausências ou momentos de pressa em momentos importantes de suas vidas por causa dos estudos desenvolvidos.

Finalmente, agradeço ao meu marido, amigo, companheiro, amor, Viktor Falcão, que incontáveis vezes me ajudou, me alegrou, me descontraíu nessa difícil caminhada, e me amou a todo tempo.

## RESUMO

*Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular usado em diversos processos fermentativos desde a antiguidade. Essa levedura é muito utilizada na produção de álcool, desse modo, estudam-se diversas cepas com o objetivo de desenvolver uma capaz de suportar melhor aos estresses fermentativos, o que por sua vez, possibilitará um aumento de sua capacidade produtiva. As altas temperaturas e o aumento da concentração de etanol são condições comuns, mas que podem estressar a levedura, diminuindo assim a produtividade. A alta pressão hidrostática (HHP) se mostra como um bom modelo de estudo dos estresses ocorridos na fermentação, e pode ser utilizada para aumentar a tolerância das cepas, devido ao mecanismo de proteção cruzada, que está relacionada com uma resposta geral ao estresse. O aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as baixas temperaturas também apresentam vias que se enquadram nessa resposta geral. As ferramentas de bioinformática têm se mostrado de grande auxílio na integração de vias de regulação, de modo a melhorar a compreensão de respostas em diferentes experimentos através de estudos do metabolismo celular. Estes podem auxiliar a eleição de vias capazes de tornar a levedura mais resistente e produtiva. Neste trabalho utilizamos dados disponíveis na literatura de experimentos de microarranjos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a diferentes estresses. Separamos os dados em sete classes e foram analisados os padrões de expressão gênica em Y440, BT0510 e BT0605 em diferentes tratamentos do estresse de HHP, assim como tratamentos de estresse etílico, térmico e oxidativo na cepa DBY9434. Observamos que as cepas submetidas a alta pressão hidrostática apresentavam um perfil de expressão gênico muito similar, com exceção da classe de transporte de membrana plasmática, sinalização e polaridade celular. Essa categoria foi estudada com maior profundidade para entendermos a piezotolerância apresentada pela cepa Y440 no estresse de HHP, dessa forma observamos a indução do transportador de glicerol-3-fosfato, que gerou um estresse oxidativo na célula. Constatamos também a indução de parte da via das pentoses fosfato, que pode ter ocorrido como resposta a esse estresse oxidativo. Outra particularidade observada foi a indução da síntese de aminoácidos sulfurados, resposta específica da HHP. As respostas aos estresses a que a cepa DBY9434 foi submetida mostraram-se

similares entre si, e inferimos isso ao fato de que os estresses selecionados para as análises apresentam vias comuns de resposta ao estresse entre si. As cepas Y440, BT0510 e BT0605, submetidas às mesmas condições de estresse, mostraram respostas muito similares também, demonstrando um certo padrão de resposta geral comum a esse estresse. As ferramentas de bioinformática foram úteis para o estudo da modificação dos padrões de expressão gênica nesse grupo de estresses demonstrando que apesar de modificações em genes específicos ocorrerem existe um modelo de resposta celular através da modificação de vias chaves para a manutenção da sobrevivência da célula.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*. Alta pressão hidrostática. Estresse Fermentativo. Microarranjo. Bioinformática.



## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* is an unicellular fungus used in many fermentation process since ancient times. This yeast is widely used in the ethanol production, thereby various strains are studied in order to develop a able to withstand the fermentation stress, which in turn will provide increased its production capacity. The high temperatures and increased ethanol concentration are common, but can be stress the yeast, thereby decreasing productivity. High hydrostatic pressure (HHP) appears as a good model for studying the fermentation stresses and can be used to increase the tolerance of the strains due to cross-protect mechanism, which is associated with an overall response to stress. The increase in reactive oxygen species (ROS) and low temperatures have pathways that fall into this general response too. The bioinformatics tools have proved of great assistance in the integration of regulatory pathways in order to improve understanding of responses in different experiments using cell metabolism studies. These can help the process of election able to make more durable and productive yeast. In this paper, we use data available in literature from microarray experiments of *Saccharomyces cerevisiae* strains under different stresses. We split the data into seven classes and gene expression patterns were analysed in Y440, BT0510 and BT0605 in different treatments of HHP stress, as well as, ethyl, thermal and oxidative stresses in DBY9434. We observed that the strains subjected to high hydrostatic pressure had a very similar gene expression profile, with the exception of the plasma membrane transport, signaling and cell polarization class. This category was studied in greater depth to understand the piezotolerance presented by the Y440 strain in HHP stress, thus we observed induction of glycerol-3-phosphate shunt, that generated oxidative stress in the cell. We also note the pentose phosphate pathway (PPP) induction, that which may have occurred as a response to such oxidative stress. Another feature observed was the sulfur amino acid synthesis induction too, a specific response of HHP stress. The responses to stresses to which the DBY9343 strain underwent were similar to each other, and we infer that the fact that the stresses selected for the analyzes have common stress response pathways between them. The Y440 strains, BT0510 and BT0605, subject to the same stress conditions, showed very similar responses also showing a certain standard of general common response to this stress.

Bioinformatics tools were useful for the study of the modification of gene expression patterns in this stress group demonstrated that despite changes that occur in specific genes exists a cellular response model by modifying key routes for the maintenance of cell survival.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. High Hydrostatic Pressure. Fermentation stress. Microarray. Bioinformatics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Gráfico de distribuição da produção de cana-de-açúcar por região no Brasil. (Fonte Conab, 2014).....	17
<b>Figura 2:</b> Estresses ambientais em potencial que <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sofrem durante a fermentação alcoólica (Fonte: BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2009 - modificado).....	19
<b>Figura 3:</b> Esquema das principais vias do metabolismo energético em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
<b>Figura 4:</b> Micrografia de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : (a) 0,1 MPa e (b) 200 MPa por 30 minutos. (FERNANDES et al., 2001).....	32
<b>Figura 5:</b> Rotas para a aquisição de tolerância em resposta da célula ao estresse (Fonte: COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001 - modificado).....	35
<b>Figura 6:</b> Fluxograma de trabalho.....	25
<b>Figura 7:</b> Diagram de Venn. (a) Tratamento 50 MPa por 30 minutos. (b) Tratamento 50 MPa por 30 minutos seguido de incubação à pressão ambiente (0,1 MPa) por 15 minutos.....	50
<b>Figura 8:</b> Gráfico de regulação gênica nas cepas nos diferentes tempos do tratamento. De (a) a (c) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440, total de 88 genes; (b) BT0510, total de 802 genes; (c) BT0605, total de 832 genes. De (d) a (f) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (d) Y440, total de 705 genes; (e) BT0510, total de 1905 genes; (f) BT0605, total de 2185 genes.....	52
<b>Figura 9:</b> Gráfico de regulação gênica das cepas dois-a-dois e as três em conjunto nos diferentes tratamentos. De (a) a (d) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440+BT0510, total de 42 genes; (b) Y440+BT0605, total de 35 genes; (c) BT0510+BT0605, total de 543 genes; (d) Y440+BT0510+BT0605, total de 31. De (e) a (h) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (e) Y440+BT0510,	

total de 562 genes; (f) Y440+BT0605, total de 620 genes; (g) BT0510+BT0605, total de 1448 genes; (h) Y440+BT0510+BT0605, total de 537 genes.....54

**Figura 10:** Análise temporal da expressão gênica diferencial nas classes formadas de acordo com o banco de dados do MIPS, em porcentagem. O padrão não hachurado corresponde ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos e o hachurado ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido de 0,1 MPa por 15 minutos. Classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. (a) Y440, (b) BT0510 e (c) BT0605.....57

**Figura 11:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. De (a) a (c) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440; (b) BT0510 e (c) BT0605. De (d) a (f) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (d) Y440; (e) BT0510 e (f) BT0605.....59

**Figura 12:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica nas cepas dois-a-dois e as três em conjunto, de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. De (a) a (d) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440+BT0510; (b) Y440+BT0605; (c) BT0510+BT0605 e (d) Y440+BT0510+BT0605. De (e) a (h) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (e) Y440+BT0510; (f) Y440+BT0605; (g) BT0510+BT0605 e (h) Y440+BT0510+BT0605.....60

**Figura 13:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica na cepa DBY9434 nos diferentes tratamentos descritos em Gash et al., 2000; de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. (a) Tratamento por alta temperatura (25 °C para 37 °C); (b) Tratamento por baixa temperatura (37 °C para 25 °C); (c) Tratamento oxidativo (0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e (d) Tratamento etílico (8% etanol).....63

**Figura 14:** Via metabólica da bomba de glicerol-3-fosfato ativada no estresse de alta pressão hidrostática.....64

**Figura 15:** Parte inicial da via da pentose fosfato ativada no estresse de HHP.....66

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{m}$  – Micrometros

Acetil CoA – Acetil Coenzima A

AMP – Adenosina monofosfato

atm – Atmosferas

ATP – Adenosina Trifosfato

$\text{Cd}^{2+}$  - íons Cádmio

$\text{Cu}^{2+}$  - íons Cobre

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxiribonucleic Acid)

ESR – genes de resposta ao estresse ambiental (do inglês element of stress response)

$\text{FAD}^+$  – Dinucleotideo de Flavina e Adenina (do inglês Flavin Adenin Dinucleotide)

$\text{Fe}^{2+}$  - íons Ferro

$\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio

HHP – Alta pressão hidrostática (do inglês High Hydrostatic Pressure)

HSE – Elementos de choque térmico (do inglês Heat Shock Elements)

HSP – Proteínas de choque térmico (do inglês Heat Shock Proteins)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIPS – Centro de informação de Munique sobre proteínas sequenciadas (do inglês Munich Information Center for Proteins)

mM – Milimolar

MPa – Megapascal

NaCl – cloreto de sódio

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ORF – Janela aberta de leitura (do inglês Open Reading Frame)

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Indústria Alcooleira.....	16
1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
1.3	Metabolismo Energético de Leveduras .....	21
1.4	Estresse na Fermentação .....	24
1.4.1	Estresse por Altas Temperaturas.....	25
1.4.2	Estresse Etílico .....	26
1.5	Estresse por Baixas Temperaturas .....	27
1.6	Estresse Oxidativo .....	29
1.7	Alta Pressão Hidrostática (HHP) na Célula .....	31
1.8	Resposta Geral ao Estresse .....	34
1.9	Microarranjo e Bioinformática .....	39
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	Objetivos Geral .....	42
2.2	Objetivos Específicos .....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
3.1	Linhagens utilizadas, condições de crescimento, tratamentos e microarranjos .....	43
3.2	Análises computacionais.....	43
3.2.1	Análise da expressão gênica diferencial obtida por dados de microarranjo em três cepas de <i>S. cerevisiae</i> submetidas ao tratamento de HHP .....	45



3.2.2	Classificação e análise da expressão gênica diferencial das três cepas submetidas ao tratamento de HHP. ....	46
3.2.3	Classificação, análise e comparação da expressão gênica diferencial de <i>S. cerevisiae</i> submetida a diferentes estresses ambientais.....	47
3.2.4	Estudo das modificações na expressão diferencial de genes envolvidos na classe de transporte de membrana, sinalização e polaridade celular nas cepas selvagens.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1	Análise da expressão gênica diferencial obtida por dados de microarranjo em três cepas de <i>S. cerevisiae</i> submetidas ao tratamento de HHP	49
4.2	Classificação e análise da expressão gênica diferencial das três cepas submetidas ao tratamento de HHP. ....	55
4.3	Classificação, análise e comparação da expressão gênica diferencial de <i>S. cerevisiae</i> submetida a diferentes estresses ambientais.....	61
4.4	Estudo das modificações na expressão diferencial de genes envolvidos na classe de transporte de membrana, sinalização e polaridade celular nas cepas selvagens. ....	64
5	CONCLUSÕES.....	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

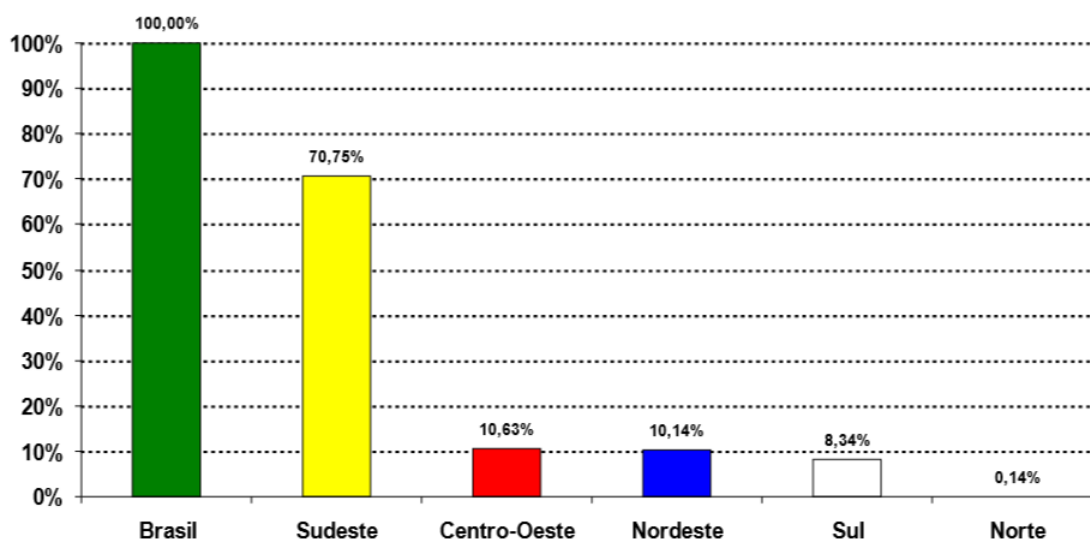
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Indústria Alcooleira

O foco para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro no período atual está na competitividade e modernização através da utilização de tecnologias para gerar sustentabilidade, é o que afirma o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa visão permitirá abastecer 200 milhões de brasileiros e gerar um excedente exportável para aproximadamente 200 países (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014).

O Brasil é um grande produtor mundial de cana-de-açúcar, devido aos fatores climáticos favoráveis, como temperatura entre 16 e 33 °C, alta incidência de raios solares, disponibilidade de água no solo etc. Graças a essas condições favoráveis, o país se tornou um dos principais responsáveis pelo açúcar comercializado no mundo, juntamente com a Índia. A produção é concentrada na região sudeste, principalmente em São Paulo, porém a cana é cultivada em todo país como mostra a figura 1 (Conab, 2014).

Segundo o MAPA, estima-se que a produção brasileira cresça 1,8% ao ano no período entre 2012/13 – 2022/23, porém para atender o crescimento do consumo interno e a exportação essa taxa deverá ser superior. Apesar das estimativas e da necessidade de aumento da produção, a agroindústria canavieira não está em um dos seus melhores momentos, existe um declínio acentuado de produtividade e qualidade da cana-de-açúcar (Canaplan, 2015).



**Figura 1:** Gráfico de distribuição da produção de cana-de-açúcar por região no Brasil. (Fonte Conab, 2014).

É esperada uma produção na última safra de 2014 de 642,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar nos aproximadamente 9 milhões de hectares plantados. Observa-se uma baixa de cerca de 2,5% na produção em relação à safra anterior, essa queda poderia ser maior, por volta de 4,6%, se não fosse o aumento na área plantada, em cerca de 2,2% (Conab, 2014).

A produção de etanol para a safra 2014/2015 é estimada em 28,66 bilhões de litros, 2,53% a mais do que na anterior. O estado do Espírito Santo nessa última safra é de 3814,1 mil toneladas, sendo o 11º estado em rendimento (Conab, 2014).

Dessa forma, observamos que a melhor maneira de haver um aumento na produção de etanol é a melhoria no processo industrial. A matéria-prima tem diminuído, logo deve-se buscar melhorar a sua utilização afim de se conseguir uma maior produtividade.

Sabemos que os microrganismos são os responsáveis pelo processo fermentativo do caldo de cana. Os estudos de produtividade têm focado na modificação das rotas metabólicas desses organismos buscando um aumento da tolerância desses às condições estressantes do processo.

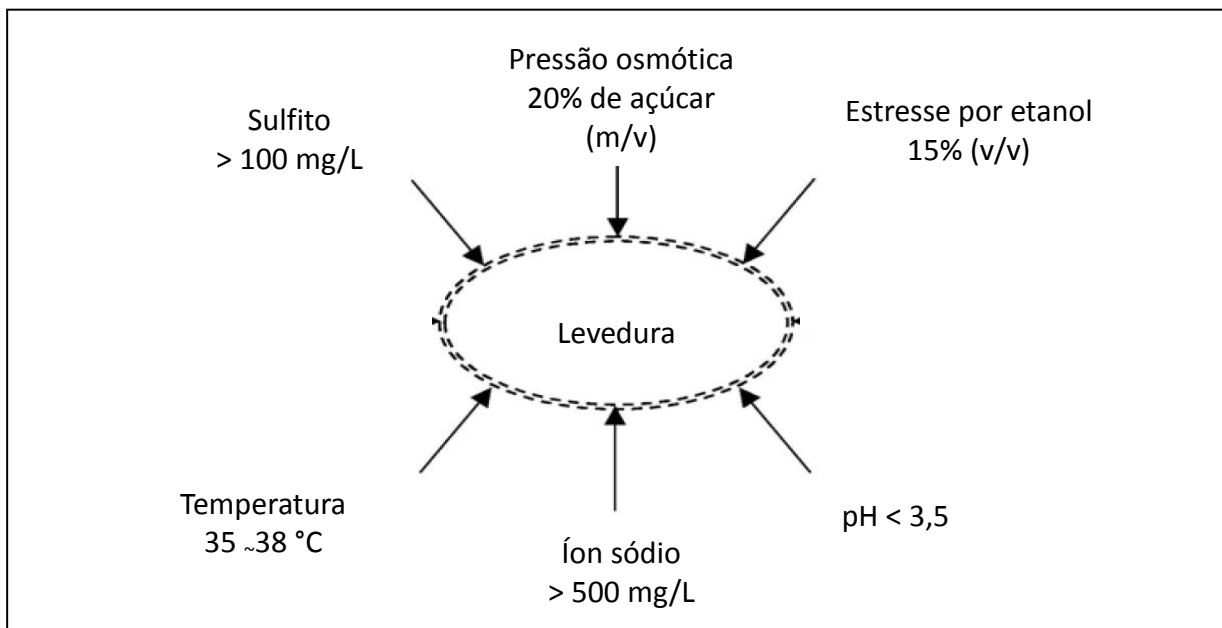
Várias são as bebidas derivadas da fermentação da cana-de-açúcar, entre elas destacamos a cachaça, uma bebida destilada típica do Brasil. Sua graduação alcoólica está entre 38% e 48% em volume a 20 °C, e é obtida pela destilação do mosto fermentado. Seu consumo médio é de 11 litros por ano por cada indivíduo no Brasil, sendo assim a bebida destilada mais consumida no país. Por esses valores o governo a reconhece como um produto de grande potencial de exportação. A produção anual é de aproximadamente 1,3 bilhões de litros por ano, sendo cerca de 14,8 milhões de litros exportados. (JUSTINO; MUTTON; MUTTON, 2005; SILVA; FOGEL, 2009; CAMPOS et al., 2009). E apresenta algumas cachaças com certificado de qualidade do International Taste & Quality Institute da Bélgica, com nota 95, em uma avaliação de 0 a 100 (AGazeta, 2015).

O mercado no estado gera em torno de 5 mil empregos diretos, e tem uma produção estimada em 20 milhões de litros/ano. Há cinco anos atrás haviam cerca de 300 alambiques no estado, destes 120 eram registrados, porém atualmente contamos com cerca de apenas 80. Os números são preocupantes mostrando o declínio do mercado, e um dos principais fatores apontados é o aumento dos impostos (AGazeta, 2015).

É de costume o produtor utilizar na fermentação uma cepa de *S. cerevisiae* advinda da própria cana, dessa forma cada cachaça apresenta características sensoriais únicas.

O processo fermentativo se inicia com a verificação dos níveis de maturação da cana e, após a moagem, ocorre a separação das impurezas mais densas e medida do índice de sacarose, e posteriormente, o mosto segue para a dorna de fermentação. Depois do processo fermentativo e filtração, ocorre a destilação para atingir o teor alcoólico da bebida.

*S. cerevisiae* é muito utilizada em diversos meios produtivos, e adquiriu certa resistência às condições estressantes que ocorrem no processo, como temperatura, osmolaridade e concentração de nutrientes altas, acidez e presença de substâncias inibidoras, como mostra a figura 2.



**Figura 2:** Estresses ambientais em potencial que *Saccharomyces cerevisiae* sofre durante a fermentação alcoólica (Fonte: BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2009 - modificado).

Com as dificuldades enfrentadas no processo fermentativo a transformação de leveduras torna-se uma alternativa na tentativa para minimizá-las. A melhoria de *Saccharomyces* se torna possível graças aos muitos estudos desenvolvidos. Essa levedura é bem caracterizada, no entanto até o presente momento não se tem uma cepa que seja resistente aos estresses que ocorrem durante a fermentação, mostrando que muito ainda é necessário se estudar sobre essa cepa para o desenvolvimento de um processo otimizado e com maior rendimento.

## 1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura, uma espécie de fungo unicelular. Por definição esses organismos são eucariotos, imóveis, heterotróficos e com parede celular bem definida (FERNANDES et al., 2009).

Suas células apresentam geralmente formato elipsoidal, com tamanhos variando entre 5 e 10  $\mu\text{m}$  em seu maior diâmetro e de 1 a 7  $\mu\text{m}$  no diâmetro menor (FERNANDES et al., 2009; KREGER-VAN RIJ, 1987). Podem ser encontradas cepas com diferentes ploidias, sendo as haplóides com volume celular de aproximadamente 29  $\mu\text{m}^3$ , e as diplóides com 55  $\mu\text{m}^3$ , podendo este volume aumentar com a idade (KREGER-VAN RIJ, 1987).

Os fungos leveduriformes formam um grupo homogêneo no que se trata de vias centrais de metabolismo de carbono, porém apresentam-se complexos e heterogêneos em se tratando de número de isoenzimas, de mecanismos de absorção de nutrientes e regulação do processo fermentativo e respiratório, mesmo sendo em sua maioria organismos aeróbios facultativos (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2005; MADIGAN et al., 2010). Essa plasticidade e sua capacidade de adaptação permitem que esses organismos sejam estudados em diferentes fases metabólicas e de crescimento e utilizados em processos fermentativos diversos (CONCEIÇÃO et al., 2015).

O gênero *Saccharomyces* se destaca por compreender espécies que apresentam divisão por gemulação ou brotamento, alta capacidade fermentativa e que possuem ascósporos ovais que não são liberados do asco durante a reprodução sexuada (KREGER-VAN RIJ, 1987).

Essas duas primeiras características citadas permitiram uma ampla utilização desses organismos em estudos eucarióticos e na indústria. Além disso, é relevante lembrar que esses organismos apresentam crescimento em meio definido, não são patogênicos ao homem, tem ciclo de vida de aproximadamente 1,5 horas, utilizam diversas fontes de carbono para a produção energética e possuem metabolismo facultativo.

Devido às facilidades citadas acima, e outras, *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro eucarioto, e também organismo modelo, a ter seu genoma completamente sequenciado. Em abril de 1996 a sequência completa foi depositada em um banco de dados público: *genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/*. *S. cerevisiae* apresenta cerca 12 Mb de bases nitrogenadas e 6200 genes organizados em 16 cromossomos (GOFFEAU et al., 1996).

Muitos dos principais mecanismos de resposta em eucariotos são conservados, assim, essa levedura se tornou um bom modelo de célula para estudos eucarióticos de resposta a estresses ambientais (HOHMANN, 2002; FERNANDES et al., 2004; LOS; MURATA, 2004). Dessa forma, atualmente nenhum outro organismo é tão bem caracterizado bioquímica, celular, molecular e geneticamente (FERNANDES, 2005). Com isso a sua utilização também tem aumentado na indústria biotecnológica.

*Saccharomyces* apresenta uma grande habilidade de adaptação ao processo fermentativo, que inclui uma grande capacidade de produção etílica, tolerância a pH baixo, a altas concentrações de açúcar e etanol e resistência a inibidores presentes nos hidrolisados das biomassas (NEVOIGT, 2008; CONCEIÇÃO et al., 2015).

Cepas laboratoriais, industriais e selvagens apresentam diversas características diferentes devido a variabilidade da espécie e às modificações feitas através de técnicas de manipulação e seleção genética. Graças a isso observa-se uma adaptação a diversos ambientes e fontes energéticas (MADIGAN et al., 2010). Esse ponto é favorável para o desenvolvimento de uma cepa com um melhor rendimento no processo.

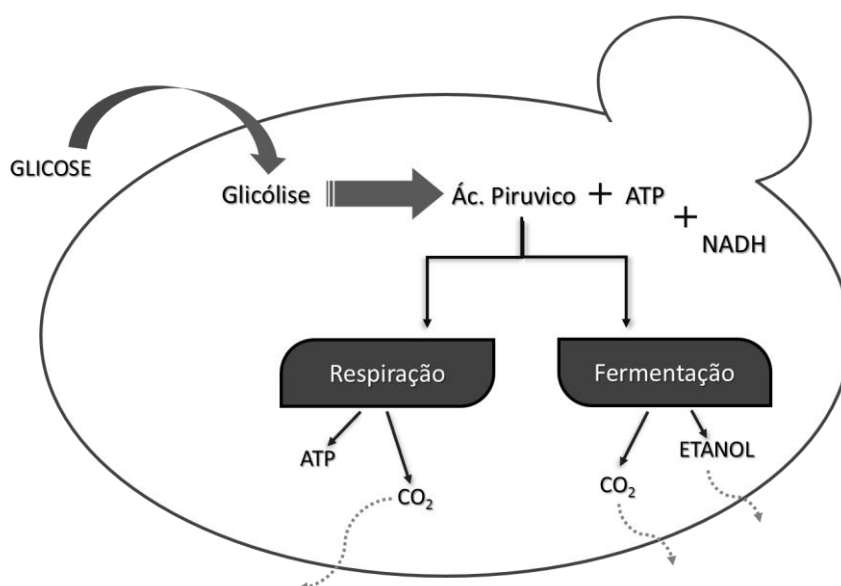
### **1.3 Metabolismo Energético de Leveduras**

O processo fermentativo é o responsável pela produção direta de dióxido de carbono e etanol a partir de uma biomassa. Esse processo é conhecido e utilizado desde a antiguidade por povos egípcios e israelitas.

Data-se de 1836 as primeiras investigações que apontavam leveduras como as responsáveis por esse processo. Em 1837, Schwann classificou esses organismos como fungos. Apenas em 1860 Pasteur levou a população científica da época a aceitar que o processo fermentativo se devia a microrganismos. Duas décadas após, Emil Christian desenvolveu técnicas de

isolamento de leveduras e propôs a taxonomia para o grupo, nomeando um grande número de espécies (BARNETT, 2004).

Os compostos orgânicos são a fonte energética de leveduras, sendo os carboidratos a origem primordial de carbono e de energia. A glicose é o principal substrato para a maioria das vias metabólicas. Imediatamente após a entrada desse composto na célula ocorre sua fosforilação, essa é a primeira etapa da glicólise, processo no qual a molécula de glicose será convertida em piruvato, formando ATP e equivalentes reduzidos como o NADH. O ácido pirúvico formado pode ser levado a diferentes vias, sendo a respiração e a fermentação os principais para a produção de energia celular, como mostra a figura 3 (FELDMANN, 2012; LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).



**Figura 3:** Esquema das principais vias do metabolismo energético em *Saccharomyces cerevisiae*.

Na respiração o piruvato é descarboxilado à acetil CoA pelo complexo multienzimático da piruvato desidrogenase através de consecutivos processos oxidativos que ocorrem na matriz mitocondrial. O acetil CoA por sua vez entra no ciclo do ácido tricarboxílico, onde ocorrerá a sua completa oxidação em duas moléculas de dióxido de carbono, NADH e FADH<sub>2</sub>. Esses equivalentes redutores são direcionados para a membrana mitocondrial interna, onde ocorre



a cadeia transportadora de elétrons. Esse processo reoxida esses compostos reciclando-os e gerando ATPs (FELDMANN, 2012; LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

No processo fermentativo o piruvato é descarboxilado e reduzido a etanol e dióxido de carbono pela ação de duas enzimas. A piruvato descarboxilase (Pdc1p) age inicialmente convertendo o ácido pirúvico em acetaldeído, e posteriormente a álcool desidrogenase (Adh1p e Adh2p) catalisa a redução do acetaldeído a etanol. Durante o processo ocorre a reoxidação do NADH em NAD, liberando-o novamente para a glicólise e mantendo o balanço redox (FELDMANN, 2012; LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

Sabe-se que o processo respiratório tem um maior saldo energético do que o fermentativo, porém em determinadas circunstâncias a célula desvia o seu metabolismo dependendo das condições ambientais. São conhecidos 3 efeitos principais: Pasteur, Custer e Crabtree (FELDMANN, 2012; LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

O efeito Pasteur é indicado pela repressão da fermentação em ambientes com pouco ou nenhum oxigênio juntamente com concentrações de açúcar abaixo de 5mM ou limitação nutricional. Dessa forma a via metabólica é desviada para a respiração, garantindo assim a produção de ATP necessária para a manutenção da atividade celular (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2005; FELDMANN, 2012).

O efeito Custer estimula o processo fermentativo pela aeração no ambiente e inibe a fermentação na ausência de oxigênio, acredita-se que esse efeito ocorra devido ao estresse redutivo que ocorre na célula (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2005; SCHEFFERS; WIKÉN, 1969). Aparentemente, as leveduras em que esse efeito é observado não tem a capacidade de realizar um balanço entre NAD<sup>+</sup>/NADH através da síntese de glicerol ou quaisquer outros compostos altamente reduzidos. As leveduras que apresentam esse efeito são conhecidas como Custer positivas, já *S. cerevisiae* não o apresenta, sendo considerada Custer negativa (SCHEFFERS; WIKÉN, 1969).

O efeito Crabtree é caracterizado pela inibição da respiração em condições aeróbicas e em altas concentrações de glicose. Dessa forma, o processo

fermentativo é favorecido pelo fato de a glicose, em altas concentrações, inibir a síntese de enzimas da via respiratória ou inativá-las, ou por regular negativamente os transportadores de açúcares, que causam um efeito de repressão catabólica (DE DEKEN, 1966 apud BARFORD; HALL, 1979; FELDMANN, 2012). Altas concentrações de glicose podem também ativar os fatores de transcrição Rap1p e Gcr1p, gerando um aumento na expressão de ADH1, o que favorece a fermentação (SANTANCELO; TORNOW, 1990). Essas concentrações elevadas podem também alterar a velocidade da glicólise, aumentando-a, dessa forma existe um maior aporte energético, o que reduz a necessidade da fosforilação oxidativa e do consumo de oxigênio. Além disso, pode-se observar, concomitantemente ao efeito, a ruptura de estruturas mitocondriais (FELDMANN, 2012).

O processo de repressão causado pela glicose em biomoléculas é uma adaptação que permite à célula transformar glicose unicamente em etanol e dióxido de carbono. Esse processo ocorre no início das bateladas de fermentação, porém a desrepressão ocorre com o declínio dos níveis de glicose extracelular, resultando na indução da síntese de enzimas da via respiratória (FELDMANN, 2012).

#### **1.4 Estresse na Fermentação**

Estresse é toda variação na condição externa à célula que a leva a modificações em suas atividades metabólicas e crescimento. A capacidade de resposta e adaptação aos estímulos externos é o que torna os organismos capazes de sobreviverem (BRAVIM, 2011). E como foi descrito anteriormente o processo fermentativo acarreta inúmeros estresses à *Saccharomyces cerevisiae*, e apesar de ser bem adaptada, muito ainda precisa ser estudado para que a produtividade final desse processo seja aumentada (GIBSON, 2007).

No início da fermentação o mosto apresenta grande concentração de açúcar, o que leva a célula a um estresse osmótico. Durante o processo esse estresse é minimizado, visto que a glicose é consumida. Entretanto, a fermentação é exotérmica, liberando calor, o que leva a célula a um novo estresse, o térmico. Outro fator que torna essa condição bastante relevante é que existem dificuldades no controle e na manutenção da temperatura nas dornas de fermentação, esses fatos em conjunto levam esse estresse a permanecer durante todo o processo. Quando a fermentação está terminando a quantidade de etanol sintetizada pela levedura pode levar a um estresse etílico. Cada uma dessas condições acarreta a diminuição da produção, pois a célula modifica o seu perfil transcricional na tentativa de minimizar possíveis danos.

#### **1.4.1 Estresse por Altas Temperaturas**

As condições ótimas para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* giram em torno de 30 °C, essa média também se aplica para o processo fermentativo. Porém muitas vezes as dornas de fermentação atingem temperaturas acima de 40 °C (TREVISOL et al., 2011).

A resposta ao choque térmico é a mais bem caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae*. Experimentos em que as células são transferidas de sua temperatura ótima de crescimento para 40 °C mostram uma repressão da síntese proteica e uma parada imediata na primeira fase da interfase, G1, que compreende os eventos do metabolismo celular vital. Concomitantemente inicia-se a síntese e acúmulo do dissacarídeo trealose e o aparecimento das proteínas de choque térmico, as HSPs (BECKER; CRAIG, 1994).

Essas proteínas podem atuar como chaperonas que contribuem com o enovelamento de outras proteínas. Como exemplo temos as Hsp60p, Hsp70p e Hsp90p que atuam sequestrando proteínas desnaturadas; a Hsp104p, atuando na dissolução de agregados proteicos intracelulares ou na degradação de proteínas (BECKER; CRAIG, 1994; PARSELL; KOWAL; LINDQUIST, 1994).

Outra HSP de grande importância é a Hsp12p, porém não se conhece exatamente a sua atuação. Cepas que superexpressam essa proteína e são submetidas a estresse térmico tiveram cerca de 90% de sobrevivência, enquanto que a cepa selvagem e as modificadas na expressão de outras proteínas apresentaram taxas entre 62% e 69%. Confirmando a importância dessa proteína para a termotolerância (BRAVIM et al., 2013).

O fator de transcrição Hsf1p ativa a transcrição de elementos de choque térmico (HSE) presentes na região promotora de genes induzidos pelo calor (PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001; VOELMMY, 2004).

#### **1.4.2 Estresse Etílico**

O etanol é um dos principais problemas no processo fermentativo por ser muito tóxico à célula em concentrações altas. Inúmeros são os seus efeitos na fisiologia das células, como inibição do crescimento, redução da viabilidade, diminuição do rendimento fermentativo, aumento da permeabilidade da membrana, inativação de enzimas essenciais ao metabolismo, entre outros (ALEXANDRE et al., 2001; AGUILERA; RANDEZ-GIL; PRIETO, 2007; CANETTA; ADYA; WALKER, 2006; MARZA; CAMOUGRAND; MANON, 2002).

A membrana celular é o principal alvo para a ação do etanol. Esse atua inserindo regiões hidrofóbicas, modificando a polaridade das membranas, sua organização e sua fluidez (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994). A composição da membrana celular é predominantemente de ácido palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1), que são monoinsaturados. O gene OLE1 é responsável pela síntese do ácido oleico. Em cepas que apresentam deleção desse gene e receberam suplementação com esse ácido demonstraram uma maior sobrevivência do que as cepas que não a recebiam, demonstrando assim a menor atuação do ácido palmitoleico na tolerância ao estresse etílico (MARTIN; QUAIN; SMART, 2003).

Outros estudos compararam *Saccharomyces* com leveduras que apresentam em suas membranas ácidos poli e monoinsaturados. Esses mostraram que essa composição não é tão favorável para a resistência ao estresse etílico. (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994; KIM; KIM; CHOI, 2011).

Outro lipídeo que auxilia na sobrevivência de leveduras em meios contendo etanol é o ergosterol. Cepas deficientes na biossíntese de ergosterol não conseguem se reproduzir em ambientes com concentrações medianas desse álcool. Por outro lado, cepas que apresentam maiores concentrações de ergosterol em suas membranas conseguem sobreviver melhor. O ergosterol tem função similar ao colesterol nas células de mamíferos, ele aumenta a rigidez da membrana plasmática (INOUE et al., 2000; SHOBAYASHI et al., 2005).

O efeito do etanol ocorre também na parede celular. Tratamentos com 10% e 20% de etanol causam modificações na morfologia, entretanto, quando as cepas são tratadas com 30% de etanol, ou estressadas por 1h, observamos que a superfície celular fica rugosa e ocorre diminuição do volume celular total (CANETTA; ADYA; WALKER, 2006).

### **1.5 Estresse por Baixas Temperaturas**

Estudos mostram que em temperaturas entre 10 °C e 18 °C a transcrição de aproximadamente  $\frac{1}{4}$  dos genes de *Saccharomyces* é afetada (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002). Outros efeitos comuns observados são a diminuição da fluidez da membrana plasmática e da difusão, alterações na topologia molecular e na cinética enzimática (GAST et al, 1993; THIERINGER; JONES; INOUE, 1998; INOUE, 1999).

Estudos mostraram que as respostas a baixas temperaturas dependem do tempo de exposição. Em um período inicial de até 4h existe uma resposta relacionada à síntese de fosfolipídeos, através da indução dos genes INO1 e

OPI3, e aumento da síntese de ácidos graxos, pela indução de OLE1 (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002; SCHADE et al, 2004). Do mesmo modo, ocorre uma grande indução de proteínas ribossomais (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002). Após esse período, podendo chegar a até 24h, esses genes sofrem repressão, e são ativados genes típicos de estresse, como alguns genes da família das HSPs (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002; SCHADE et al, 2004; HOMMA et al, 2004; MURATA et al, 2006).

Os genes HSP12, HSP26, HSP42, HSP104, SSA4, SSE2 e YRO2 são alguns exemplos de genes induzidos no intervalo de 4 a 12h nas temperaturas de -80 °C, 0 °C, 4 °C e 10 °C. No mesmo período de tempo a 10 °C, CIS3, HMS2, HSC82, HSP30, HSP60, HSP78 e outros são reprimidos (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002; SCHADE et al., 2004; HOMMA et al., 2004; MURATA et al., 2006; KANDROR et al., 2004; ODANI et al., 2003).

A alteração no padrão de síntese de carboidratos é outra resposta comum ao estresse e outras condições adversas. As reservas de glicogênio começam a ser formar em baixas temperaturas em tempos maiores do que 4h, através da indução de GLG1, GSY1, GLC3, GAC1, GPH1 e GDB1. Já as reservas de trealose se formam devido a indução de TPS1, TPS2 e TSL1. Ocorre também a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, como CTT1, TTR1 e GTT2 (AGUILERA, RADEZ-GIL, PRIETO; 2007).

Membros da família DAN/TIR codificam genes como TIP1, TIR1, TIR2 e TIR4 em temperaturas como 10 °C, 4 °C e 0 °C. Esses são manoproteínas. Concomitantemente, ocorre o estímulo de proteínas da família PAU, como PAU1, PAU2, PAU4, PAU5, PAU6 e PAU7, que realizam a síntese de fosfolípidios (SAHARA; GODA; OHGIYA, 2002; HOMMA et al., 2004; SCHADE et al., 2004; MURATA et al., 2006; PANADERO et al., 2006; KANDROR et al., 2004; ZHU et al., 2001).

Uma das principais barreiras a serem vencidas pelas células em baixas temperaturas é o perigo da imobilização (STUKEY; MCDONOUGH; MARTIN, 1990). As propriedades dinâmicas e de organização celulares são de extrema relevância para a manutenção da sobrevivência sob esse estresse, com isso a produção de desaturases é de grande importância, pois auxiliam na

manutenção da fluidez celular, assim como a produção de manoproteínas e ácidos graxos (RODRÍGUEZ-VARGAS et al., 2007; WOLFE; BRYANT, 1999).

## 1.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais possuem ou são capazes de gerar moléculas com um ou mais elétrons não pareados. Como exemplos dessas espécies temos o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (KILEY; STORZ, 2004). A formação dessas espécies ocorre normalmente em condições aeróbicas. Principalmente na mitocôndria, pelo processo de fosforilação oxidativa, onde o oxigênio é reduzido no complexo citocromo oxidase (HALLIEWELL, 1989).

Estudos mostram que ROS apresentam um importante papel na sinalização celular através de modulação de vias de transdução de sinais intra e intercelular e balanço redox, em processos fisiológicos normais e em condições estressantes (GHEZZI; BONETTO; FRATELLI, 2005; WU; CEDERBAUM, 2003). Em condições normais essas espécies estão balanceadas com compostos antioxidantes, não ocasionando dessa forma danos à célula. Ao ocorrer algum desbalanciamento, as ROS podem se tornar nocivas ao material genético e as membranas, pois desencadeia reações que levam a modificações em proteínas e lipídeos (FARR; KOGOMA, 1991).

As vias de MAP quinase respondem a estímulos externos e regulam atividades celulares diversas. Dentre elas, as vias regulada por sinais oxidativos (ERK), quinase c-jun amino-terminal (JNK), p38 ativada por MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e a resposta ao choque térmico são as principais vias de sinalização ao estresse oxidativo. Porém essas não são exclusivas dessa condição de estresse, elas fazem parte do metabolismo e crescimento celular normal, assim também como da resposta a choque térmico etílico, osmótico, a

exposição a metais pesados, dentre outros (FINKEL; HOLBROOK, 2000; MORADAS-FERREIRA et al., 1996; JAMIESON, 1998).

*Saccharomyces cerevisiae* responde a diferentes fontes de estresse com alteração da defesa por antioxidantes, tanto as formas enzimáticas como as não-enzimáticas (DAWES, 2004). Essa reação pode estar envolvida com a ativação da resposta da célula e com a aquisição de tolerância contra um possível estresse oxidativo severo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

O estresse oxidativo pode ser causado tanto pela formação de ROS, como é o caso de exposição a metais com propriedades redox, como o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^{2+}$ , ou pela diminuição dos níveis de substâncias que atuam como antioxidantes, como ocorre com a glutathiona em meios com excesso de  $\text{Cd}^{2+}$  (POCSI; PRADE; PENNINCKX, 2004).

A peroxidação lipídica gerada pelo acúmulo de ROS decorre da reação do componente pró-oxidante com um ácido graxo insaturado de membranas, modificando assim suas propriedades físico-químicas. Esse processo é uma reação em cadeia que pode oxidar um grande número de moléculas lipídicas, principalmente os fosfolípidos que contêm ácidos graxos polinsaturados. Observa-se então uma diminuição da permeabilidade iônica das mesmas, o que pode afetar a transdução de sinais. Constata-se também o aumento na tensão das membranas, o que acarreta a diminuição da fluidez e aumenta a possibilidade de rompimento (VENDEMIALE; GRATAGLIANO; ALTOMARE, 1999).

O acúmulo de ROS pode levar à carbonilação de proteínas devido a oxidação de grupamentos laterais, principalmente se estes forem compostos por resíduos de prolina, arginina, lisina e treonina. São formados derivados desses aminoácidos muito estáveis quimicamente (DALLE-DONNE et al., 2003). Devido a isso, os grupos carbonil em proteínas são muito utilizados para se avaliar a intensidade do dano oxidativo (STADTMAN; LEVINE, 2000).

Uma resposta não enzimática ao estresse oxidativo que ocorre é a biossíntese de glutathiona (GSH). O gene GSH1 codifica a enzima  $\gamma$ -glutamylcisteina sintase, que é requerida na síntese de glutathiona. Essa molécula atua sequestrando radicais livres através de seu grupamento sulfidril que apresenta atividade



redox, formando um persulfureto, a glutathiona oxidada (GSSG) (JAMIESON, 1998).

Outra resposta ao estresse oxidativo, assim como exposição a metais pesados, observa-se a ativação de YAP1 e SKN7. De modo que cepas que apresentam deleção nesses fatores de transcrição são hipersensíveis ao estresse oxidativo. Yap1p e Skn7p são responsáveis pelo controle da regulação de moléculas e proteínas que atuam nas defesas antioxidantes como glutathiona, as tioredoxinas Trx1p/Trx2p, as superóxidos dismutases Sod1p/Sod2p e as catalases Cta1p/Ctt1p (PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004).

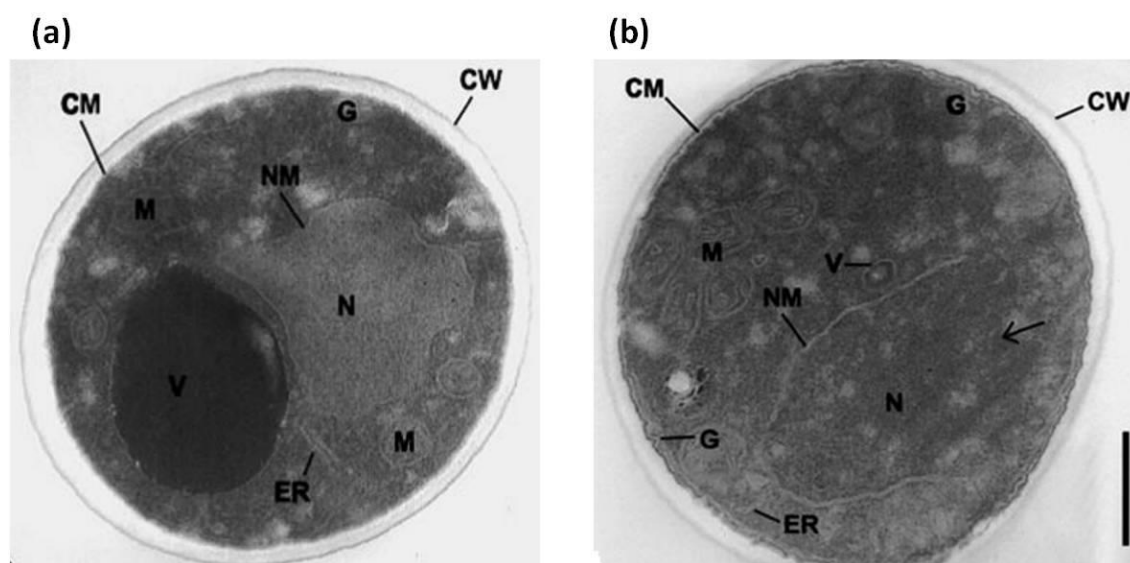
### **1.7 Alta Pressão Hidrostática (HHP) na Célula**

A alta pressão hidrostática (HHP) é um parâmetro termodinâmico definido como a força aplicada sobre uma superfície em direção perpendicular a ela. Foi introduzida no campo biológico no século XIX, com a proposta de substituir a radiação na indústria alimentícia, e uma possível utilização na medicina.

A HHP é um fator físico que causa modificação nos organismos vivos, como morte ou parada do ciclo celular, inibição do crescimento e outras. Porém, muitos organismos aquáticos vivem sob pressões elevadas, considerando a pressão atmosférica na superfície, que é aproximadamente 1 atm, ou 0,1 MPa. Além disso, células de articulações em animais ou vasos condutores de plantas, ocasionalmente, são submetidas a pressões relativamente altas, entre 20 MPa e 100 MPa (ELO et al., 2004; PETERS, HAGEMANN; DERI TOMOS, 2000).

A HHP tem como característica a redução do volume do sistema e a síntese de substâncias de menor volume em uma reação química. Essas mesmas observações são feitas em células, ocorrendo um achatamento da mesma, assim como de suas estruturas, e alterações no equilíbrio das reações (MENTRÉ et al., 1999).

A membrana celular é o principal alvo da alta pressão hidrostática, assim como do estresse por baixas temperaturas. As alterações ocorridas são, principalmente, devido à compactação dos lipídeos, dessa forma ocorre a redução de fluidez e espessura, dificultando processos de transporte intra e extracelular (BRAGANZA; WORCESTER, 1986; REYES; TAUC; BROCHON, 1993; ZIMMERMAN, 1971). As membranas internas também sofrem alterações como mostra a figura 4, que compara a organização interna de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae* em pressão de 0,1 MPa e outra submetida a 200 MPa por 30 minutos (FERNANDES et al., 2001).



**Figura 4:** Micrografia de células de *Saccharomyces cerevisiae*: (a) 0,1 MPa e (b) 200 MPa por 30 minutos. (FERNANDES et al., 2001).

Proteínas citoplasmáticas também sofrem alterações. Pressões entre 20 e 40 MPa são capazes de alterar sua funcionalidade e conformação, apesar de que para a desnaturação sejam necessárias pressões acima de 500 MPa (MOLINA-GARCIA, 2002). As proteínas são reorganizadas sob o efeito da HHP, pois as moléculas de água são forçadas para os domínios hidrofóbicos e/ou eletricamente carregados, levando a redução do volume e enfraquecimento da estrutura proteica (MENTRÉ; HUI BON HOA, 2001; SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001).

As interações que ocorrem entre as proteínas e o DNA também são perturbadas. Por exemplo, a enzima BamHI perde a afinidade com a sua região

alvo no DNA devido a alterações estruturais induzidas por pressões de 30 MPa (LYNCH; SLIGAR, 2002). Além disso, pressões subletais, como 50 MPa, causam inibição da síntese de DNA (FERNANDES; FARINA; KURTENBACH, 2001). Porém a síntese de RNA não sofre alterações mesmo em pressões acima de 100 MPa, mostrando-se assim mais resistente do que a síntese de DNA (YAYAMOS; POLLARD, 1969).

A organização celular também é facilmente modificada, visto que pressões de 20 MPa também podem levar os microtúbulos à dissociação (ROBINSON; ENGELBORGH, 1982; SALMON, 1975).

Em uma observação geral, temos também que reações que geram espécies ionizadas têm seu equilíbrio alterado para a formação das mesmas. Essas apresentam maior interação com a água, devido as forças de atração entre elas, o que leva a uma redução do diâmetro das moléculas formadas (ABE; KATO; HORIKOSHI, 1999). Tal fato foi observado em *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a HHP. As células tratadas tinham uma maior acidez, provavelmente pela dissociação de prótons do  $H_2CO_3$  e de açúcares fosforilados (ABE; HORIKOSHI, 1995; 1997).

Estudos mostram que células que apresentam deleção no gene TPS1 se tornam mais sensíveis a HHP quando em fase exponencial de crescimento, porém em fase estacionária não existe grande diferença na sobrevivência. Esse estudo demonstra que outras substâncias sintetizadas na fase exponencial de crescimento auxiliam na sobrevivência celular em condições estressantes além da trealose. Fato corroborado por experimentos que mostram que a cepa mutante em TPS1 adquire baroresistência após um pré-tratamento térmico (FERNANDES; PANEK, KURTENBACH, 1997; FERNANDES; FARINA; KURTENBACH, 2001). E um fator intrigante no estresse por alta pressão hidrostática é que as vias de síntese e de degradação estão induzidas, apesar de ainda assim haver o acúmulo desse carboidrato (BRAVIM et al., 2013).

No caso de alguns genes envolvidos no metabolismo aeróbio, a HHP mantém os seus níveis de transcrição, no caso de outros porém, ocorre a sua indução. Esse aumento do padrão de expressão pode ocorrer imediatamente após

aplicado o estresse, ou necessitar do tempo de repouso de 15 minutos à pressão de 0,1 MPa (BRAVIM et al., 2013). Como exemplo verifica-se que a produção de acetil CoA está aumentada pela superexpressão de ACS1 e LPD1, porém não são observadas modificações nas vias de biossíntese de ácidos graxos, dessa forma esse composto é desviado para o ciclo do ácido cítrico (BRAVIM et al., 2013).

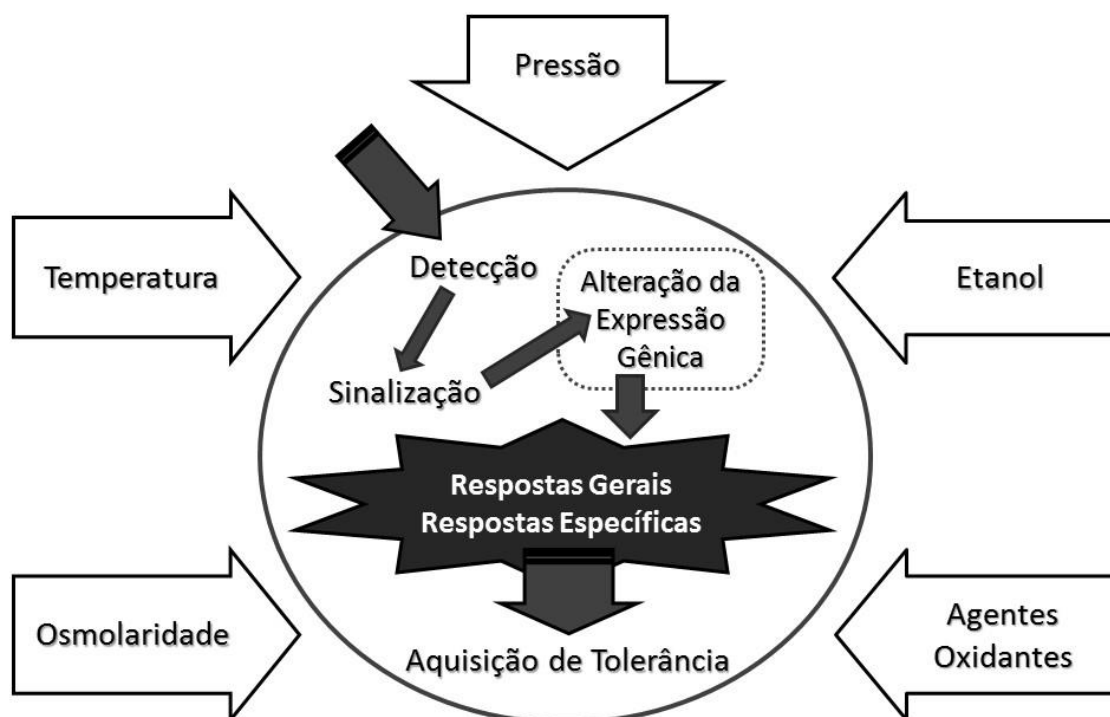
As evidências sugeririam que o metabolismo anaeróbio está reprimido, porém observou-se que partes da mesma se encontravam induzidas, como é o caso da produção de etanol, que apresentou aumento da expressão de PDC1 e ADH1. Outro fator interessante é que as cepas submetidas a HHP e ao tempo de recuperação de 15 minutos e introduzidas no processo fermentativo tiveram um melhor desempenho do que cepas não pressurizadas e que não passaram pelo tempo de recuperação (BRAVIM et al., 2013).

Observa-se que o estresse de alta pressão hidrostática não tem uma resposta essencialmente igual ao estresse por temperatura, ou por etanol, ou oxidativo, mas apresenta uma resposta única e complexa fisiologicamente (MENTRÉ; HUI BON HOA, 2001; FERNANDES, 2005; PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004). Porém, esses estresses apresentam partes compartilhadas de vias de respostas, como citados anteriormente. Dessa forma podemos utilizar a HHP como um modelo para o estudo das respostas a esses estresses (PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004).

## **1.8 Resposta Geral ao Estresse**

A sobrevivência de um organismo depende de sua capacidade de responder a alterações do ambiente onde está. O mecanismo molecular que é induzido quando os organismos são expostos a condições adversas é denominado de 'resposta ao estresse'. Esse mecanismo tem por função proteger as células contra potenciais efeitos deletérios do estresse, assim como auxiliar a célula a reparar quaisquer danos já sofridos (SIDERIUS; MAGER, 1997). Para tal

resposta o organismo modifica o seu padrão de expressão gênica, de forma a se adaptar ao novo ambiente a sua volta, se adequando assim às novas condições de crescimento (Fig. 5) (CRAIG, 1992; COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Essas alterações podem levar a célula a se tornar tolerante a estresses de mesma natureza de forma transiente (HOHMANN; MAGER, 2003; STRASSBURG et al., 2010).



**Figura 5:** Rotas gerais de aquisição de tolerância em resposta da célula ao estresse (Fonte: COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001 – modificado).

De forma geral, é observado uma repressão de genes relacionados a síntese proteica e ao ciclo celular, e uma indução de genes relacionados a metabolismo de carboidratos, enovelamento proteico, defesa contra espécies reativas, reparo do DNA e outras (GASCH et al., 2000). Esses genes estão, em sua maioria, relacionados a um fenômeno conhecido como proteção cruzada (LEWIS; LEARMONTH; WATSON, 1995).

Existem três fases distintas que ocorrem durante a resposta a qualquer estresse. A primeira fase é marcada por mudanças imediatamente após a

percepção do estresse. Os processos de defesa ocorrem apenas na segunda fase. Esses podem ser mecanismos gerais entre os estresses ou específicos de cada um. A adaptação caracteriza a terceira fase. Nesse ponto a célula volta com o seu ciclo celular e proliferação. Essas fases podem ser distintas e facilmente observáveis ou não, dependendo do estresse e da sua intensidade (HOHMANN; MAGER, 2003).

Uma das primeiras respostas ao estresse é a parada do ciclo celular na fase G1. Essa parada é denominada 'Start', e é necessária para que a célula analise as condições do meio. Se as condições externas forem favoráveis, a célula continua o ciclo até a anáfase. Caso contrário, a célula não continua até a fase S, e entra em G0 que é um estado de latência (ROSE; HARRISON, 1987).

Ao entrar em estado de latência é comum o acúmulo de compostos como a trealose e o glicogênio. A trealose é um dissacarídeo que foi por muito tempo considerado de reserva, visto que existe um acúmulo natural desse composto na fase estacionária de crescimento celular. Porém observou-se que na verdade sua síntese era aumentada em condições desfavoráveis à célula, de modo que esse carboidrato conferia à célula maior resistência a uma variedade de condições estressantes, inclusive as que são comuns a fermentação (CONLIN; NELSON, 2007; BENAROUDJ; LEE; GOLDBERG, 2001). Esse efeito protetor se deve em parte pelo fato de a trealose atuar como uma co-chaperona auxiliando na estabilização de proteínas. Esse carboidrato substitui as moléculas de água ao se ligar aos domínios hidrofílicos presentes na estrutura, estabilizando-a e impedindo a desnaturação e posterior agregação proteica (CONLIN; NELSON, 2007). Por muito tempo a trealose foi atrelada à resposta ao choque térmico através de uma forte correlação com as HSPs, principalmente a Hsp70. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam baixos níveis dessa HSP tem a síntese de trealose retardada em estresse térmico. Outra correlação feita foi com relação ao Hsf1. Em cepas com baixo nível de trealose a resposta transcricional de Hsf1p foi diminuída, e em cepas com altos níveis do dissacarídeo e atividade era aumentada quando as cepas eram submetidas ao choque térmico (CONLIN; NELSON, 2007; HOTTIGER et al 1992).

Ainda não é conhecido o conjunto completo de genes envolvidos na resposta ao estresse, porém sabe-se que existem genes que quando captam o estímulo estressor levam à ativação ou repressão de outros, coordenando assim a remodelação da expressão gênica. Esses são conhecidos como genes de resposta ao estresse ambiental (ESR) (ESTRUCH, 2000). Esses ESR apresentam uma sequência de elemento responsivo ao estresse (STRE), um 5'CCCCT em seus promotores. Essa sequência é reconhecida pelos fatores de transcrição MSN2 e MSN4 que são considerados chaves na regulação (GIBSON et al., 2007; NASCIMENTO, 2005; ESTRUCH, 2000).

Msn2p e Msn4p são proteínas citoplasmáticas, porém em condições estressantes se acumulam no núcleo, desencadeando assim a regulação gênica dos STRE (CAUSTON, 2001; MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Cepas com deleção nos genes MSN2/4 se mostram mais sensíveis ao estresse de HHP e de altas temperaturas do que as cepas selvagens. Porém, sob determinadas condições de estresse, mesmo com a deleção, alguns genes alvos de Msn2/4 são induzidos, mostrando assim que a resposta ao estresse é bem mais complexa, contando com vários fatores em conjunto (BOY MARCOTTE et al. 1999; DOMITROVIC et al. 2006; GASCH, 2003). A migração de Msn2p e Msn4p para o núcleo está relacionada com a diminuição da atividade da proteína quinase A (PKA), que por sua vez se relaciona com a diminuição dos níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP), causado pela baixa taxa de crescimento ocasionada pelo estresse (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Dessa forma observamos que a via cAMP-PKA regula negativamente os genes de resposta ao estresse. (NASCIMENTO, 2005).

Experimentos realizados com cepas mutantes mostraram que nas células que tiveram a via cAMP-PKA superexpressa não ocorria a parada do ciclo celular, nem acúmulo de glicogênio ou trealose, sendo essas mais sensíveis. Já as células que sofreram repressão dessa via realizavam a parada em G0 e se dividiam mais lentamente, o que as tornou mais tolerantes ao estresse por calor (FOLCH-MALLOL et al., 2004; IGUAL; ESTRUCH, 2000; NASCIMENTO, 2005).

A compreensão desses mecanismos de resposta é de grande importância biotecnológica, pois podem possibilitar a modificação de organismos tornando-

os mais produtivos, otimizando assim os processos em que esses são empregados.

Estudos com microarranjo em *Saccharomyces cerevisiae* nos confirmam as observações feitas através dos experimentos citados no que diz respeito à singularidade de cada estresse e também no que trata da resposta comum ao estresse devido a ESR (GASCH et al., 2000).

É interessante notar também que muitos dos genes que respondem a condições estressantes possuem mais de uma sequência reguladora em seu promotor, podendo ser ativados em diferentes momentos, o que nos explica a existência de uma resposta comum a alguns estresses.

Desse modo, temos um aspecto intrínseco, que é a resistência adquirida ou indução de resistência ao estresse. Diversos organismos podem resistir a estresses severos quando são anteriormente tratados de forma subletal com o mesmo estresse (SIDERIUS; MAGER, 1997). Como exemplo temos que quando *Saccharomyces cerevisiae* é pré-tratada com 0,7 M de NaCl, as células se tornam mais resistentes a um tratamento posterior com 1,4 M de NaCl (TROLLMO et al, 1988). O mesmo ocorreu com o estresse térmico (COOTE; COLE; JONES, 1991). Esses experimentos nos mostram que o pré-tratamento desencadeou uma resposta que preparou as células para o estresse severo posterior. Porém, é interessante ressaltar que esse padrão de comportamento não se aplica apenas para um pré-tratamento brando seguido de um estresse severo de mesma natureza.

Entretanto, em alguns casos, esse efeito pode se estender a outros tipos de estresse. Por exemplo, o tratamento térmico de 40 °C em *S. cerevisiae*, que é considerado um estresse não letal. Após submetermos as células à alta pressão hidrostática elas têm uma maior sobrevivência, ou seja, elas adquirem resistência ao estresse de HHP pelo pré-tratamento térmico (IWAHASHI et al., 1991; 1993).

Esse fenômeno foi observado em outras situações, e é conhecido como proteção cruzada. Ele pode ser explicado pelo fato de que muitos estresses apresentam vias comuns de resposta, como parada do ciclo celular, ajuste do metabolismo energético, síntese de proteínas HSP's, glicerol, glicogênio e



trealose. Dessa forma com um pré-tratamento consegue-se adquirir resistência a diversos estresses (FOLCH-MALLOL et al., 2004).

Entretanto, isso não é uma verdade para todos os casos. Jamieson (1992) mostrou que tratamento com  $H_2O_2$  não promove resistência contra a droga que gera superóxido menadiona, porém, o tratamento com menadiona protege as células contra o  $H_2O_2$ . Piper (1995) comprovou que o pré-tratamento com altas temperaturas torna a célula mais tolerante ao etanol, porém o contrário não ocorre. Esses experimentos afirmam que apesar de um elemento de resposta em comum, algumas alterações ocorridas são específicas para alguns estresses devido a condições ambientais e respostas únicas.

Os estudos com HHP mostraram que para que esse estresse fosse capaz de induzir proteção contra outros, era necessário que o pré-tratamento fosse seguido de uma incubação em pressão ambiente por 15 minutos. Esse tempo é necessário para que a célula se recupere e repare os danos sofridos, assim como sintetize substâncias protetoras. Dessa forma a alta pressão hidrostática se torna capaz de induzir a resistência e a proteção cruzada por até 60 minutos após o estresse ter ocorrido (PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004).

## 1.9 Microarranjo e Bioinformática

A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* é antiga e bem ampla em ambientes fermentativos. Com isso, muitos estudos são desenvolvidos, em diversas áreas da ciência, como genômica e metabolômica sobre esse organismo. Esses estudos foram facilitados após 1996, pois nesse ano o genoma dessa levedura foi sequenciado e publicado em um banco de dados público da universidade de Stanford. Porém, ainda não se tem as informações completas sobre a função de cada gene, mas essa não é uma situação exclusiva de *S. cerevisiae*.

Nos últimos anos uma grande quantidade de informação sobre o genoma tem surgido, e mesmo para organismos pouco complexos, tem-se tido dificuldades

para entender as vias, elucidar o metabolismo como um todo e descobrir a função de cada gene.

A regulação da expressão gênica ocorre principalmente a nível de transcrição, por isso existe grande interesse em técnicas que mensurem a quantidade de RNA mensageiro (RNAm) sintetizada em cada diferente tratamento e que possibilitem a comparação dessas quantidades (WILDSMITH; ELCOCK, 2001). Uma das técnicas que surgiram com esse propósito foi o microarranjo, que quantifica a abundância transcricional, de acordo com o experimento controle (GASCH et al., 2000). É um campo que ganhou espaço é a genômica funcional. Essa tem por função analisar uma grande quantidade de genes utilizando uma abordagem geral em vez de gene a gene (WILDSMITH; ELCOCK, 2001). Para auxiliar na organização, armazenamento e análise dessa grande quantidade de dados são utilizadas técnicas de bioinformática, que nos permitem analisar o genoma de um organismo ou compará-lo com outros.

Uma iniciativa que surgiu atualmente e se tornou de extrema importância para os estudos com bioinformática é o The Gene Ontology Project, disponível em <http://www.geneontology.org/>. Esse é um projeto concentra informações de organismos, o que permitiu a criação de um banco de dados que descreve os produtos gênicos por um termo e suas funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. Assim também como facilita o acesso às informações contidas em seus bancos de dados, e permite a interpretação dos seus dados.

Outro programa que auxilia na compreensão de vias de resposta é o GenMapp, disponível em <http://genmapp.org/>, que permite a montagem de vias, e a observação de vias disponíveis online, pela ferramenta wikipathways, por exemplo, e a integração dos resultados, e observação destes nas respectivas vias. Desse modo, é possível uma melhor observação dos dados de microarranjo gerados em seus resultados.

Diversos programas podem ser utilizados, vários são disponíveis online de forma gratuita. Porém, é possível também a utilização de plataformas de programação, em diversas linguagem, que permitem a integração de

programas ou a escrita de algoritmos específicos para que as análises necessárias sejam realizadas.

A indústria busca por cepas que estejam melhor adaptadas à fermentação, sendo mais resistentes aos estresses comuns ao processo. Os estudos genômicos e de bioinformática auxiliam grandemente no entendimento das vias que ocorrem naturalmente na cepa ou sob condições que necessitem adaptação. Dessa forma, essas ferramentas favorecem a observação das vias modificadas em cada processo, mostrando os pontos chaves para a maior sobrevivência e produtividade celular, assim torna-se possível inferir pontos chaves de regulação de acordo com os resultados obtidos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Geral

Analisar o perfil de expressão gênica diferencial de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* laboratoriais e selvagens em diferentes estresses por ferramentas de bioinformática.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica diferencial obtida por microarranjo em três cepas de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de HHP;
- Classificar e analisar o padrão de expressão gênica diferencial entre três cepas tratadas com HHP;
- Comparar o padrão de expressão gênica de *S. cerevisiae* submetida a diferentes estresses ambientais;
- Apontar um padrão de expressão comum de alteração genica visando a modificação genética de levedura para o incremento na fermentação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

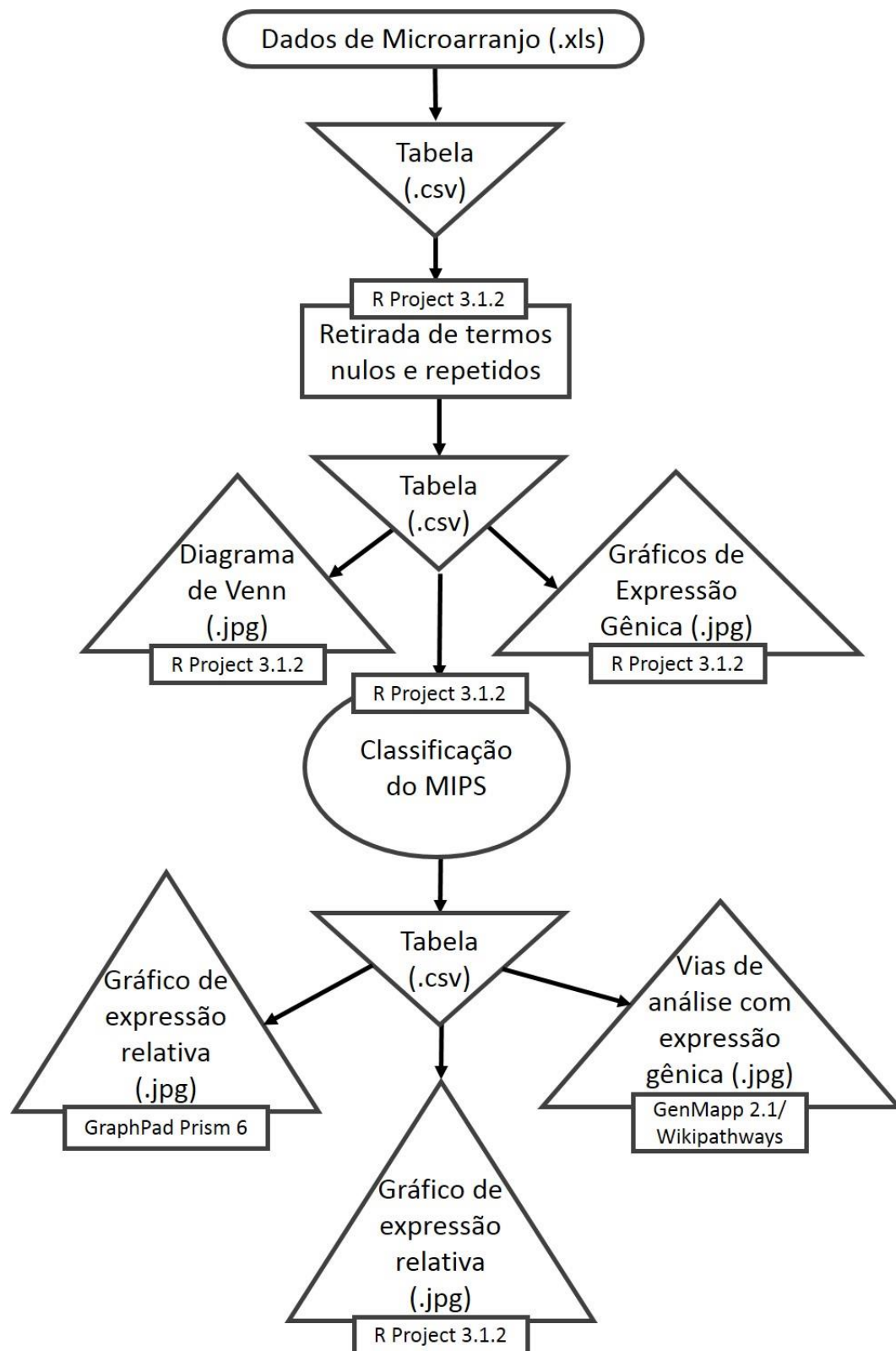
#### 3.1 Linhagens utilizadas, tratamentos e microarranjos

Dados brutos de microarranjo, disponíveis na literatura, foram utilizados nesse trabalho. As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Y440, BT0510 e BT0605 foram tratadas por 30 minutos a 50 MPa e 30 minutos a 50 MPa seguido de 1 minutos a 0,1 MPa, esses são descritos por Bravim et al. (2013). Y440 *Mat a leu2* é uma cepa laboratorial que apresenta piezotolerância se comparado com as cepas selvagens BT0510 e BT0605. Essas duas cepas foram isoladas de cachaçarias do Estado do Espírito Santo, apresentaram boa capacidade fermentativa e se diferenciam pela ploidia apresentada, a primeira é haploide, e a segunda não (BRAVIM et al., 2013). Devido a essas características essas cepas foram escolhidas para o trabalho, assim como a cepa DBY9434.

DBY9434 *MATa ura3-52 yap1::KANMX4 GAL2* foi submetida aos seguintes tratamentos: células crescidas a 37 °C e incubadas a 25 °C, de células crescidas a 25 °C e incubadas a 37 °C, tratamento com 0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratamento de 8% de etanol descritos em Gasch et al. (2000). Esses estresses apresentam algumas vias de resposta em comum, e que são observadas no processo fermentativo.

#### 3.2 Análises computacionais

As análises foram realizadas conforme o fluxograma de trabalho, figura 6.



**Figura 6:** Fluxograma de trabalho.

Os dados brutos foram analisados inicialmente na plataforma online do Gene Ontology Term Finder, disponível em <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>, com o intuito de verificar se a expressão gênica apresentada nos resultados era significativa, utilizando os valores de *p-value* de 0,1. Naturalmente muitos genes apresentam uma grande variação no perfil transcricional, através dessa análise podemos observar se as modificações no padrão de expressão encontradas são devido ao tratamento a que as células foram submetidas ou não.

Os dados se encontravam em formato .xls, esse não é aceito pelo programa R Project versão 3.1.2, obtido no site <http://www.r-project.org/>. As tabelas foram então convertidas para o formato .csv. E após isso, os dados foram importados para o programa, que já era utilizado anteriormente no laboratório. Realizou-se a retirada dos termos repetidos e dos que não apresentavam as informações completas com relação aos tratamentos realizados com as respectivas cepas. Essa etapa ocorreu em separado para os dados de Bravim et al. (2012) e Gasch et al. (2000).

### **3.2.1 Análise da expressão gênica diferencial obtida por dados de microarranjo em três cepas de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de HHP**

Com os dados do total de genes que sofreram modificação nos padrões de expressão de Y440, BT0510 e BT0605 em cada tratamento, foram criados diagramas de Venn, no próprio programa R Project. Esse tipo de gráfico possibilitou a observação dos genes que sofreram modificações nos perfis transcricionais em apenas uma cepa, ou seja, era exclusivo desta; ou em mais de uma ou em todas elas.

Os dados das cepas Y440, BT0510 e BT0605 também foram utilizados para a confecção de gráficos de pizza mostrando a regulação gênica proporcionalmente. Em uma observação inicial, os dados foram agrupados

entre genes com expressão aumentada mais de duas vezes, e mais de quatro e genes com perfil transcricional diminuído mais de duas vezes e mais de quatro. Essa análise nos permitiu observar o modelo geral de resposta ao estresse de cada cepa em cada tratamento.

Em um segundo momento, as cepas foram agrupadas duas-a-duas e as três para compararmos a quantidade de genes em comum que havia sofrido modificações em seu padrão de expressão e se esses tinham o mesmo padrão de resposta ao estresse, sofrendo aumento, diminuição ou mantendo seus níveis transcricionais.

### **3.2.2 Classificação e análise da expressão gênica diferencial das três cepas submetidas ao tratamento de HHP.**

Seguidamente, classificou-se os resultados de Bravim et al. (2012) de acordo com o banco de dados do MIPS, *Comprehensive Yeast Genome Database* (CYGD), disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/gene/proj/yeast>. Após o cruzamento dos dados através do programa R Project, confeccionou-se uma tabela que foi analisada no mesmo programa.

Os resultados gerados foram agrupados em sete classes relacionadas as funções biológicas de cada gene, que são: Metabolismo Energético; Resposta à Estímulos Ambiental; Parede e Membrana Celular; Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular; Ciclo Celular e Morfogênese; Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA; Ubiquitinação e Outros.

O número de genes com expressão modificada em cada classe e tratamento foi utilizado para a elaboração de um gráfico de barras para uma análise temporal no programa GraphPad Prism 6.

Após isso, foram criados gráficos de pizza para demonstrarem a proporcionalidade entre essas classes no perfil geral de modificação da expressão gênica, se utilizando do programa R Project. Esse tipo de gráfico foi



escolhido para demonstrar a resposta global das cepas aos estresses a que foram submetidas. Dessa forma pode-se realizar uma análise comparativa observando-se as modificações em cada classe.

### **3.2.3 Classificação, análise e comparação da expressão gênica diferencial de *S. cerevisiae* submetida a diferentes estresses ambientais.**

Assim como realizado com os dados de Bravim et al. (2012), os resultados de Gasch et al. (2000) foram classificados de acordo com o banco de dados do MIPS, e confeccionou-se, então, uma tabela que foi analisada no R Project. Posteriormente foi realizada a classificação dos resultados nas sete classes citadas anteriormente, e foram confeccionados os gráficos de pizza, assim como descrito anteriormente no tópico 3.2.2 desse trabalho.

Todos os dados utilizados nos gráficos de pizza foram anteriormente analisados estatisticamente pelo teste de proporcionalidade para que pudéssemos compará-los entre si.

### **3.2.4 Estudo das modificações na expressão diferencial de genes envolvidos na classe de transporte de membrana, sinalização e polaridade celular nas cepas selvagens.**

O programa GenMapp versão 2.1, disponível em <http://genmapp.org/>, apresenta a ferramenta do banco de dados do wikipathways, disponível também online em <http://www.wikipathways.org>, que possibilita a integração dos dados de microarranjo com as informações das vias metabólicas através de um algoritmo de integração.

Através desse programa realizamos a análise dos dados de vias metabólicas modificadas devido ao estresse de alta pressão hidrostática, e que estavam relacionadas da classe “transporte de membrana, sinalização e polaridade celular”, que havia se destacado nos ensaios anteriores sobre a possível piezotolerância da cepa Y440. Desse modo, foi possível visualizar exatamente aonde os genes estão atuando em cada via.

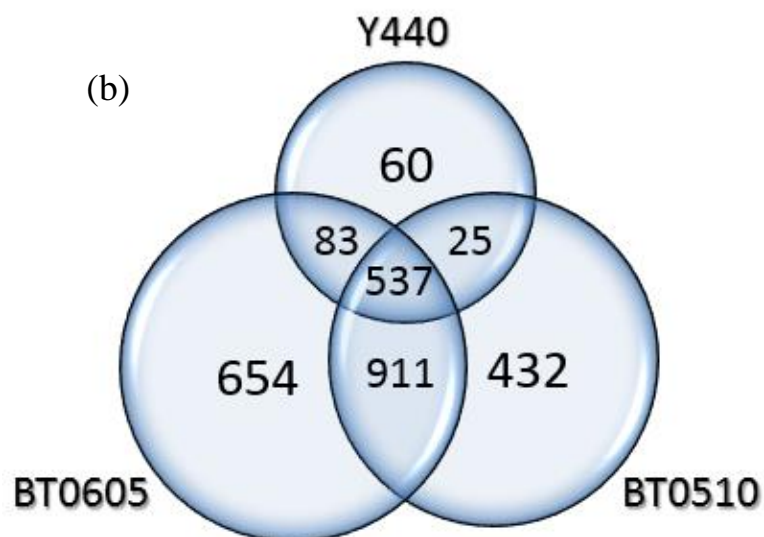
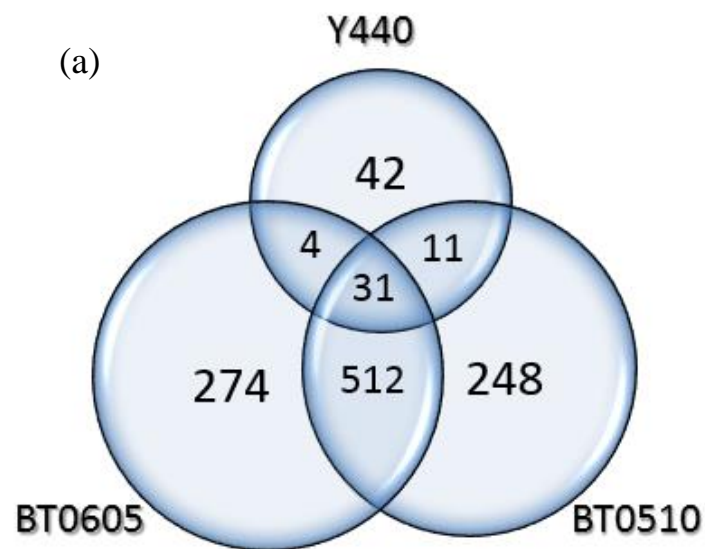
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da expressão gênica diferencial obtida por dados de microarranjo em três cepas de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de HHP

Os dados de microarranjo utilizados nessa etapa correspondem aos das cepas tratadas por Bravim et al., 2010. E com o intuito de mostrarmos a variação ocorrida na expressão gênica causada pelo estresse de alta pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae* e as discrepâncias existentes entre as respostas celulares em Y440, BT0510 e BT0605 foram criados diagramas de Venn (Figura 7). Estes apresentam o número de genes com diferença nos padrões de expressão, dessa forma observamos a quantidade de genes que é comum a duas ou as três cepas, e também quantos genes foram modificados exclusivamente em cada uma.

O momento 7a se refere ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos e o 7b ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido de incubação à pressão ambiente, 0,1 MPa, por 15 minutos. Entre esses dois diagramas observa-se um aumento significativo na quantidade total, de 1122 para 2702 genes com modificação do padrão de expressão. Esse aumento significativo se deve ao fato de que o tempo de 15 minutos é fundamental para a célula responder ao estresse de HHP e se recuperar, o que exige as maiores alterações no perfil transcricional que foram observadas (PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004).

Vale a pena ressaltar também que a cepa Y440 apresenta uma grande diferença na quantidade de genes diferencialmente expressos nos dois tratamentos. Existe um aumento de aproximadamente 8 vezes no total de genes que sofreram alterações em seu padrão de expressão, enquanto que nas outras cepas esse aumento foi bem menor, de apenas cerca de 2,5 vezes entre os dois momentos.



**Figura 7:** Diagram de Venn com o número de genes diferencialmente expressos em cada tratamento. (a) Tratamento 50 MPa por 30 minutos. (b) Tratamento 50 MPa por 30 minutos seguido de incubação à pressão ambiente (0,1 MPa) por 15 minutos.

Dentre os genes comuns às três cepas observamos um acréscimo de 17 vezes na quantidade de genes que apresentaram diferença em seu padrão de expressão, ou seja, existem 17 vezes mais genes comuns às três cepas após o tempo de 15 minutos em pressão ambiente. Esse último dado nos remete a

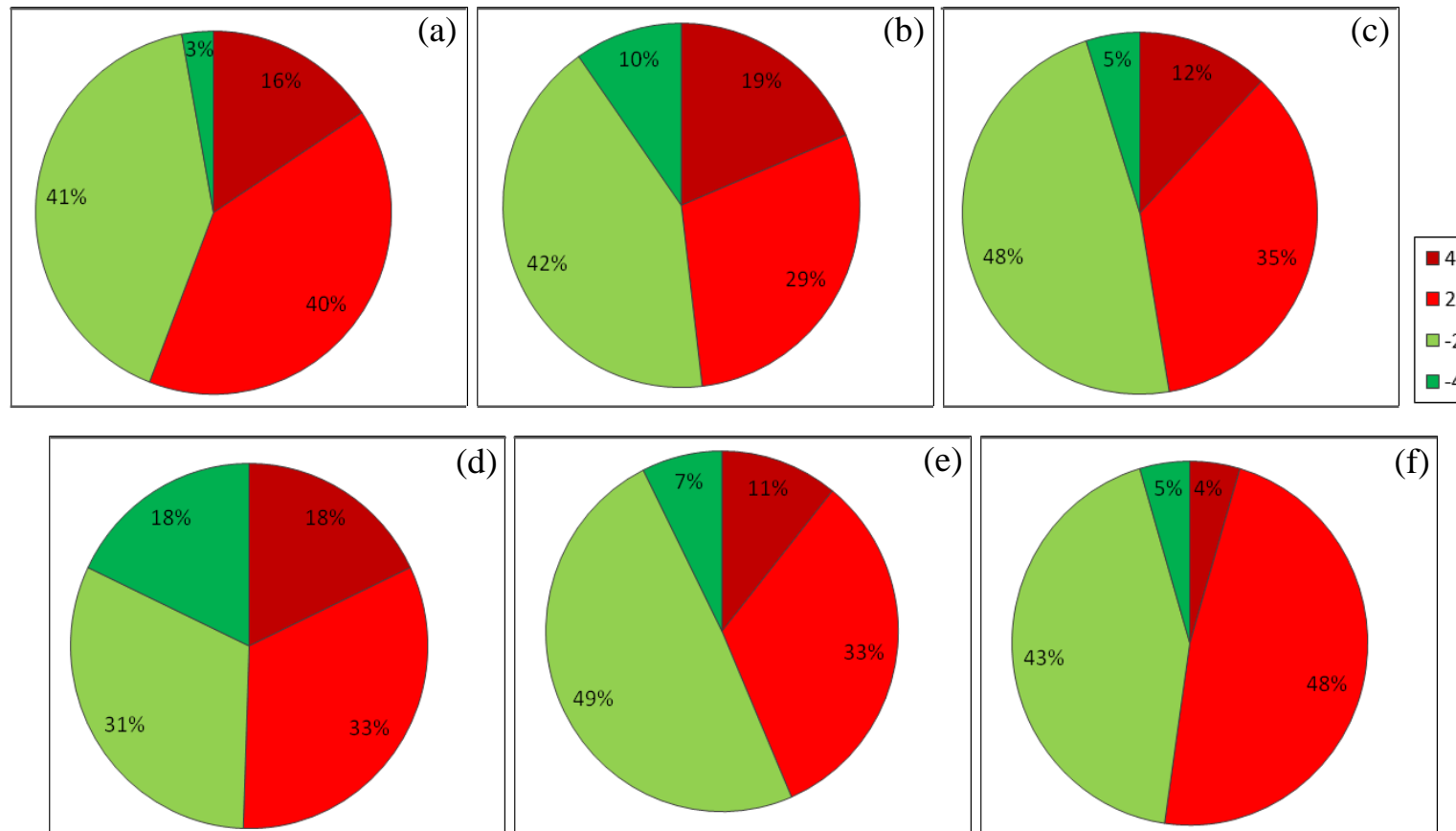
uma aproximação no padrão de expressão causado pelo tempo de recuperação celular. Esse fato sinaliza que a resposta de recuperação celular ao estresse é bem similar nos três casos estudados, apesar de suas discrepâncias já discutidas anteriormente.

Podemos observar também que a cepa Y440 apresenta um menor número de genes afetados pelo tratamento, possivelmente pelo fato de ser mais resistente ao estresse por alta pressão hidrostática do que as cepas selvagens. Cerca de 50% dos genes analisados nessa cepa apresentaram modificações no padrão de expressão exclusivamente nela no momento imediatamente após a pressão. Esse valor cai para menos de 10% no segundo tratamento, reforçando a ideia de um padrão de recuperação ao estresse muito similar entre as cepas, visto que por se tratar do mesmo estresse, ele apresenta os mesmos alvos em todas as cepas.

A diferença de ploidia existente entre as cepas selvagens não se mostrou um fator relevante na resposta a HHP. As duas cepas selvagens tiveram uma grande quantidade de genes diferencialmente expressos em comum, cerca de 65% do total em cada uma.

Outro fator analisado no estudo foram os padrões de regulação da expressão gênica positivo e negativo após o tratamento de HHP, como nos mostra a figura 8.

Observamos que, apesar das discrepâncias entre o total de genes diferencialmente expressos em cada cepa e em cada tratamento, o padrão de regulação geral das células foi similar. Possivelmente pelo fato de que cada cepa apresenta diferentes genes capazes de responder ao mesmo estímulo, dessa forma, genes diferentes, porém funcionalmente relacionados, respondem às mesmas pressões ambientais com padrões de regulação similares que são acionados pela célula durante o estresse.



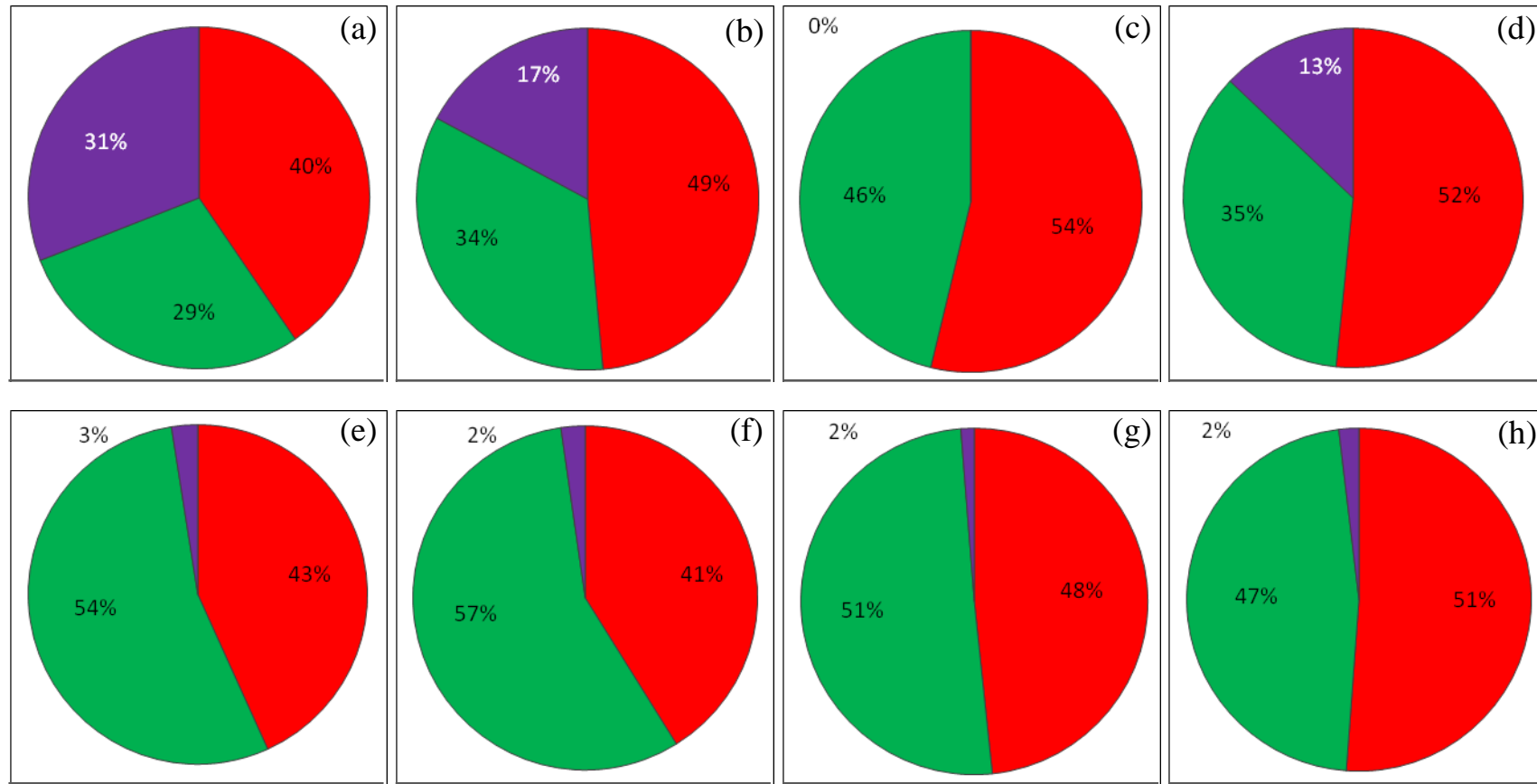
**Figura 8:** Gráfico da porcentagem de genes com expressão aumentada mais de 2x (vermelho) ou mais de 4x (vinho) ou diminuída mais de 2x (verde claro) ou mais de 4x (verde escuro) nos diferentes tratamentos. De (a) a (c) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440, total de 88 genes; (b) BT0510, total de 802 genes; (c) BT0605, total de 832 genes. De (d) a (f) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (d) Y440, total de 705 genes; (e) BT0510, total de 1905 genes; (f) BT0605, total de 2185 genes.

Observamos que, apesar das discrepâncias com relação ao número de genes que sofre alteração na regulação modificando assim o seu padrão de expressão, existe um modelo de regulação geral nas células. Possivelmente pelo fato de que cada cepa apresenta diferentes genes capazes de responder ao mesmo estímulo, assim sendo, genes diferentes, porém funcionalmente relacionados, respondem as mesmas pressões ambientais com padrões de regulação similares que são acionados pela célula durante o estresse.

O fenômeno da proteção cruzada desencadeado por HHP é adquirido transitoriamente após o tempo de 15 minutos de recuperação celular em pressão ambiente, que corresponde ao segundo tratamento (PALHANO; ORLANDO; FERNANDES, 2004). De forma interessante, podemos correlacionar esse dado com os observados na figura 8. Nas imagens 8(d), 8(e) e 8(f) observamos que a pressão de regulação sobre os genes é maior do que nas imagens correspondentes ao tratamento imediatamente após a pressão, 8(a), 8(b) e 8(c), ou seja existem mais genes que tiveram a sua expressão modificada, seja aumentando ou diminuindo, em 4x de acordo com o padrão. Propomos que durante esse tempo de recuperação a pressão de regulação sobre os genes aumenta, o que torna a célula mais resistente posteriormente, conforme observado no processo de proteção cruzada.

Outro ponto interessante a ser discutido na figura 8 é o fato de que o número de genes induzidos (porcentagem em vermelho) e reprimidos (porcentagem em verde) fica em torno de 50%. Mostrando um equilíbrio interno que a célula mantém na condição de estresse.

Um dado interessante para reafirmar a nossa discussão é apresentado na figura 9, onde observamos que, mesmo os genes comuns entre as cepas não apresentam um mesmo padrão de expressão, alguns apresentam discrepância, ou seja, em uma cepa se encontra induzido e na outra reprimido no primeiro tratamento realizado. Porém, no segundo tratamento observamos que esse padrão de expressão geral se torna mais similar, ou seja, uma maior quantidade de genes apresenta o mesmo padrão de regulação no segundo momento do que no primeiro, sustentando o que havia sido discutido anteriormente.



**Figura 9:** Gráfico de regulação gênica das cepas dois-a-dois e entre as três. As porcentagens em vermelho representam genes que tiveram a expressão aumentada nas duas cepas observadas, ou nas três, em verde observamos os genes com expressão diminuída, e em roxo os genes que apresentaram diferentes padrões entre as cepas analisadas. De (a) a (d) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440+BT0510, total de 42 genes; (b) Y440+BT0605, total de 35 genes; (c) BT0510+BT0605, total de 543 genes; (d) Y440+BT0510+BT0605, total de 31. De (e) a (h) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (e) Y440+BT0510, total de 562 genes; (f) Y440+BT0605, total de 620 genes; (g) BT0510+BT0605, total de 1448 genes; (h) Y440+BT0510+BT0605, total de 537 genes.



## **4.2 Classificação e análise da expressão gênica diferencial das três cepas submetidas ao tratamento de HHP.**

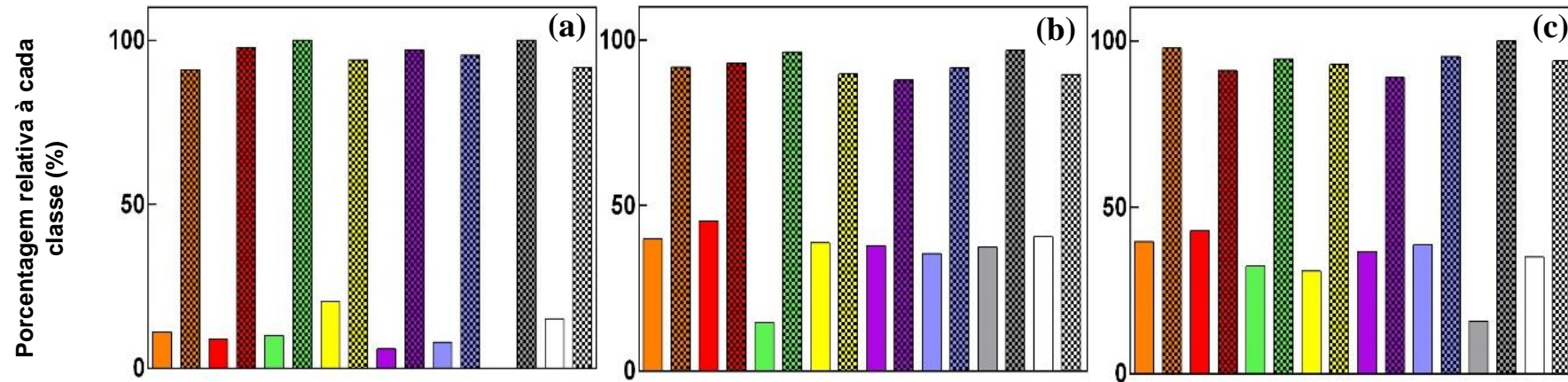
No intuito de avaliarmos quais eram as classes biológicas funcionais que apresentavam uma maior força de regulação gênica após os tratamentos com HHP, realizamos essa análise de acordo com a classificação do MIPS. Os genes foram então reorganizados para se obter um número menor de classes a serem analisadas. Essas estão listadas a seguir:

- 1 – Metabolismo Energético
- 2 – Resposta a Estímulo Ambiental
- 3 – Parede e Membrana Celular
- 4 – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular
- 5 – Ciclo Celular e Morfogênese
- 6 – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA
- 7 – Ubiquitinação
- 8 – Outros

Inicialmente nessa fase realizamos uma análise temporal do número de genes total com expressão modificada que se enquadravam em cada classe delineada. A classe “outros” se refere a genes que não se enquadravam diretamente em nenhuma das anteriormente citadas, desse modo, foram agrupados aqui.

Observou-se a porcentagem relativa de genes com expressão modificada em cada classe e montou-se a figura 10 que nos mostra que a pressão de regulação em todas as classes foi maior no segundo tratamento, assim como havia sido mostrado no perfil geral de resposta aos tratamentos.

A maior discrepância é quando nos referimos a cepa Y440, entretanto isso se deve a notada diferença entre a quantidade de genes diferencialmente expressos em cada um dos dois tratamentos.



**Figura 10:** Análise temporal da expressão gênica diferencial nas classes formadas de acordo com o banco de dados do MIPS, em porcentagem. O padrão não hachurado corresponde ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos e o hachurado ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido de 0,1 MPa por 15 minutos. Classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. (a) Y440, (b) BT0510 e (c) BT0605.

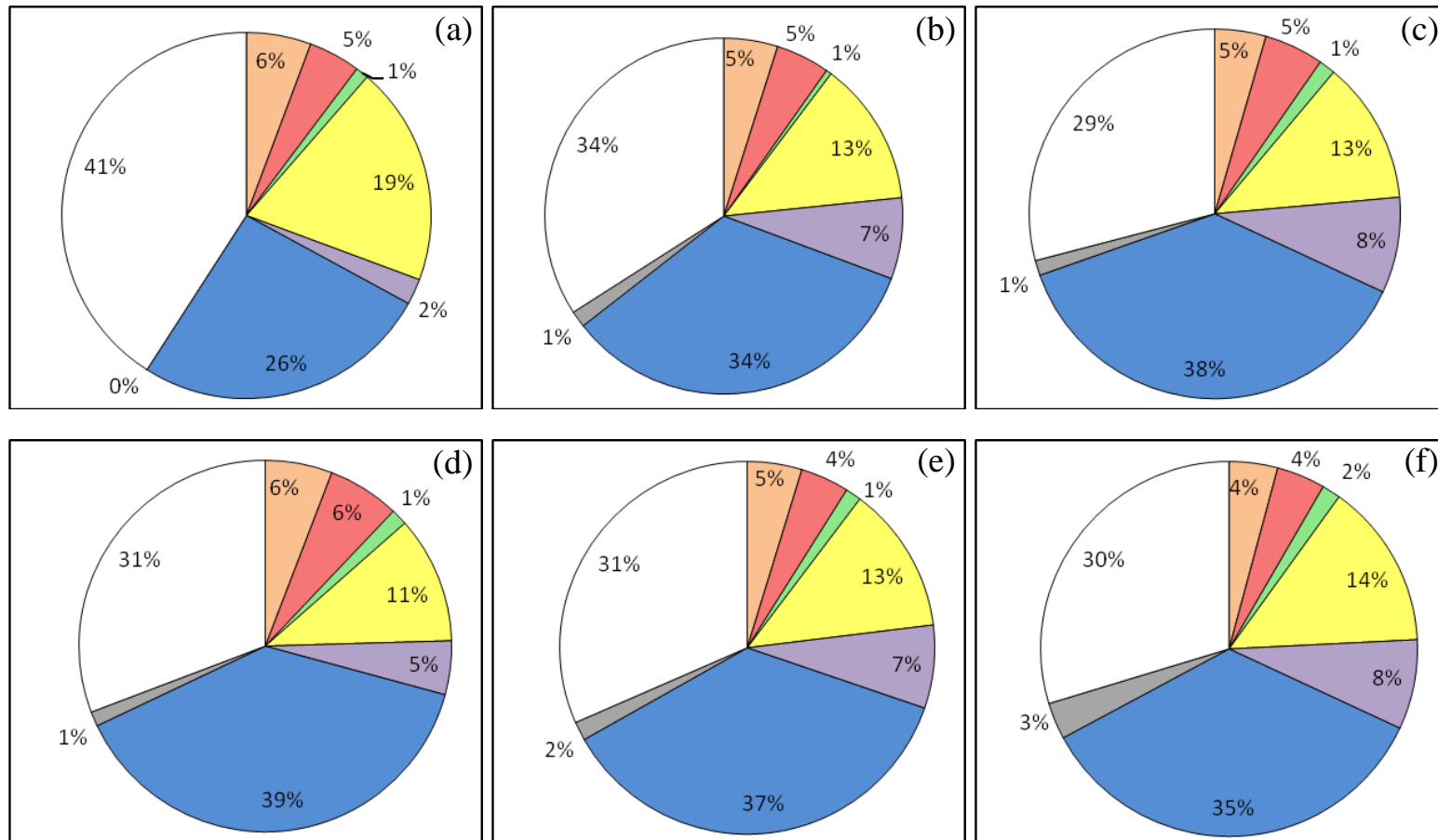
As cepas selvagens por outro lado apresentavam um perfil de expressão parecido no segundo tratamento, como era esperado de acordo com os dados apresentados anteriormente de similaridade de resposta entre as duas cepas.

Posteriormente avaliamos a interação que ocorre entre as classes criadas. Tal análise é observada na figura 11, e visualizamos que as classes interagem de forma similar nos diferentes tratamentos e cepas. As proporções de modificação no padrão de expressão se mantem nas diferentes cepas e tratamentos, principalmente nas classes “metabolismo energético”, “resposta a estímulo ambiental”, “parede e membrana celular”, “transporte de membrana, sinalização e polaridade celular”, “ciclo celular e morfogênese” e “ubiquitinação”. As diferenças observadas giram em torno de alterações entre as proporções das classes “reparo, conservação e utilização de DNA e RNA” e da classe “outros”.

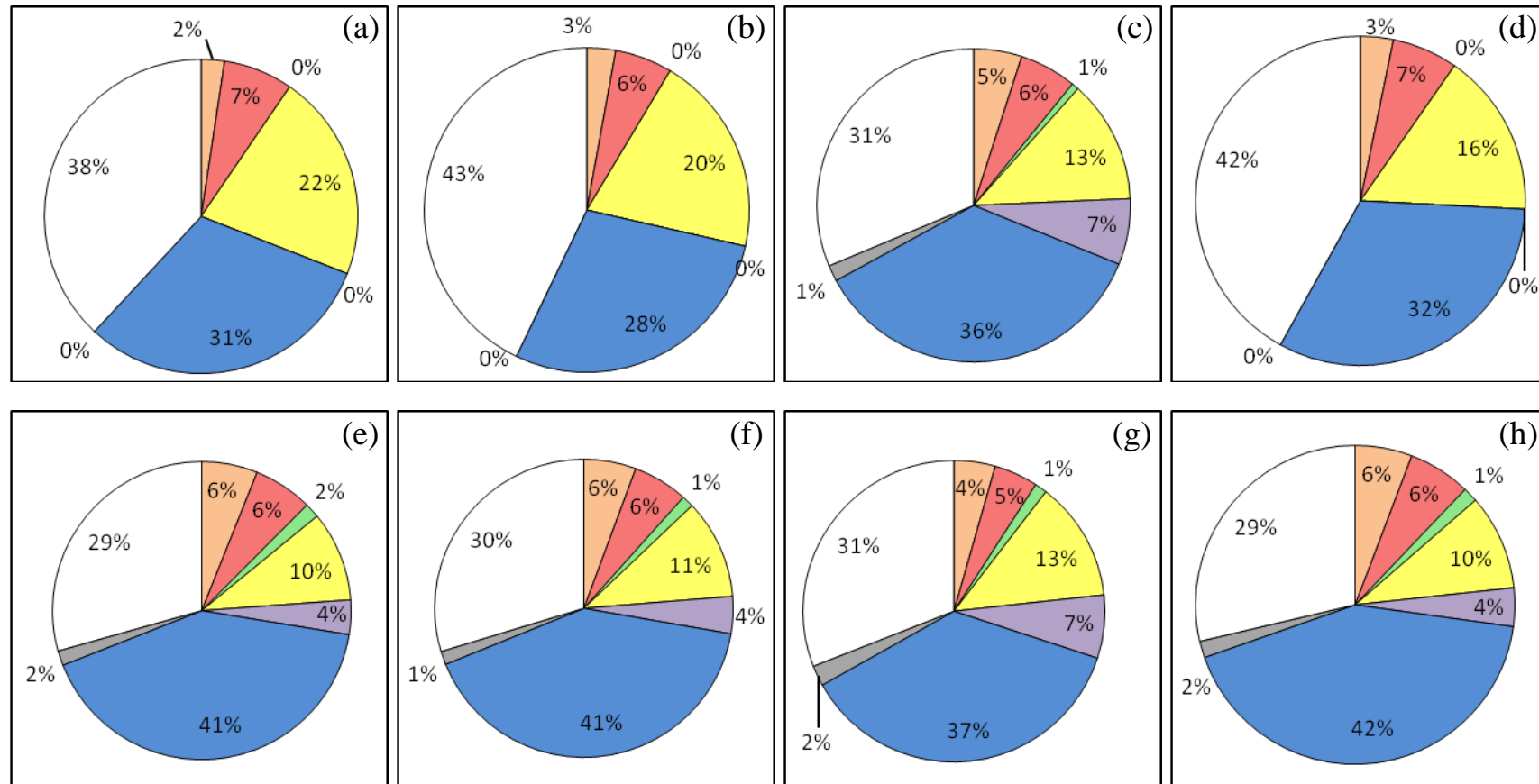
A outra discrepância observada é no que diz respeito a classe “transporte de membrana, sinalização e polaridade celular” na cepa Y440 no período imediatamente após a HHP. Observamos um aumento na proporção dessa classe em detrimento da classe “ciclo celular e morfogênese”. Esse fato nos intrigou, devido a isso discutimos de forma mais aprofundada sobre algumas vias relacionadas a ele em um tópico a parte.

Visto que anteriormente inferimos que a classe “reparo, conservação e utilização de DNA e RNA” e a classe “outros” mantem uma correlação inversa e grande variabilidade nesse tratamento não inferimos nada sobre as mesmas.

Como realizado anteriormente, nesse ponto observamos também as interações entre as classes em análises duas-a-duas e entre as três cepas e discutimos os resultados que foram observados na figura 12.



**Figura 11:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. De (a) a (c) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440; (b) BT0510 e (c) BT0605. De (d) a (f) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (d) Y440; (e) BT0510 e (f) BT0605.



**Figura 12:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica nas cepas dois-a-dois e as três em conjunto, de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. De (a) a (d) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos. (a) Y440+BT0510; (b) Y440+BT0605; (c) BT0510+BT0605 e (d) Y440+BT0510+BT0605. De (e) a (h) dados do tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguidos de 0,1 MPa por 15 minutos. (e) Y440+BT0510; (f) Y440+BT0605; (g) BT0510+BT0605 e (h) Y440+BT0510+BT0605.

Quando observamos a figura 12, as imagens 12(c), 12(e), 12(f), 12(g) e 12(h) nos chamam atenção por apresentarem o mesmo perfil entre si e mais ainda, por que os padrões de proporcionalidade das classes observadas são similares aos apresentados na figura 11 que trata de cada cepa em separado.

O tempo de 15 minutos de recuperação que é dado no segundo tratamento é necessário para levar a célula a uma maior resistência a estresses letais do processo fermentativo. Na figura 9 dessa discussão mostramos que nesse tratamento a resposta à pressão de regulação sobre os genes com diferença no padrão de expressão comuns as cepas tornam-se mais similares, ou seja, os genes passam a apresentar o mesmo padrão de expressão após o tempo de recuperação. Na figura 12, observamos que esse tempo também torna mais relacionada a resposta que ocorre entre as classes proporcionalmente.

As imagens 12(a), 12(b) e 12(d) são do tratamento de 50 MPa por 30 minutos e apresentam a cepa Y440 em suas análises. Essas apresentam um fator interessante entre elas, mostrando que uma grande porcentagem dos genes em comum entre as cepas analisadas é relacionada a classe “transporte de membrana, sinalização e polaridade celular”, se comparados com os dados do outro tratamento realizado. O que nos leva novamente a inferir a importância dessa classe na resposta dessas células ao estresse.

#### **4.3 Classificação, análise e comparação da expressão gênica diferencial de *S. cerevisiae* submetida a diferentes estresses ambientais.**

Após observado o perfil de resposta das cepas industriais e selvagens ao tratamento de HHP analisamos também a resposta da cepa DBY9434 aos tratamentos de células crescidas a 37 °C e incubadas a 25 °C, de células crescidas a 25 °C e incubadas a 37 °C, tratamento com 0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratamento de 8% de etanol referenciado por Gasch et al., 2000.

Essas análises foram realizadas através dos dados de microarranjo disponíveis em [http://www-genome.stanford.edu/yeast\\_stress](http://www-genome.stanford.edu/yeast_stress). Realizamos então a mesma classificação utilizada anteriormente separando os genes nas oito classes com base nos dados de classificação do MIPS.

Ao correlacionarmos a figura 13 com a figura 11 podemos observar as diferenças ocorridas entre o estresse de alta pressão hidrostática, de alta e baixa temperatura, oxidativo e etílico, ponderando o que é comum a eles.

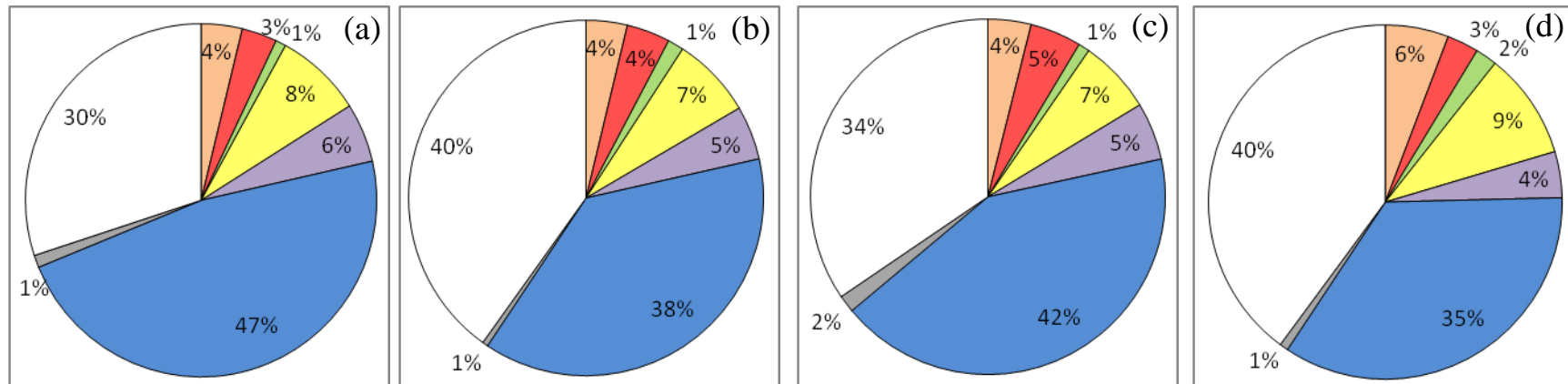
Quando analisamos apenas os dados dos estresses realizados por Gasch et al. (2000), temos um padrão similar na distribuição das classes. E observamos que a cepa submetida aos diferentes estresses se mostrou com um comportamento similar em cada um deles, como também foi observado para as diferentes cepas submetidas ao mesmo estresse, que foi o caso do tratamento submetido por Bravim, 2011.

Outro fator interessante é que as classes “metabolismo energético”, “resposta a estímulo ambiental”, “parede celular”, “ciclo celular e morfogênese” e “ubiquitinação” se assemelham com os dados obtidos da análise da distribuição das classes em todos os estresses realizados. Algumas discrepâncias foram visualizadas nas classes “reparo, conservação e utilização do DNA e RNA” e “outros”, porém da mesma forma que havia sido observada nos resultados de Bravim et al. (2010) com as alterações de proporções sendo alternadas entre elas.

É válido lembrar que no estresse por HHP a classe que se sobressaiu, possivelmente auxiliando na piezotolerância, foi a de transporte de membrana, sinalização e polaridade celular, e esta pode estar fortemente relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio, porém nem mesmo no caso do estresse oxidativo ocorreu tal indução. Desse modo, analisaremos no próximo tópico a que se deve a indução da classe em questão.

Mesmo com algumas diferenças nos padrões de expressão gênica observamos que as respostas das classes como “metabolismo energético”, “resposta ao estímulo ambiental”, “parede e membrana celular”, “ciclo celular e morfogênese” e “ubiquitinação” mostram-se similares também nesses estresses.



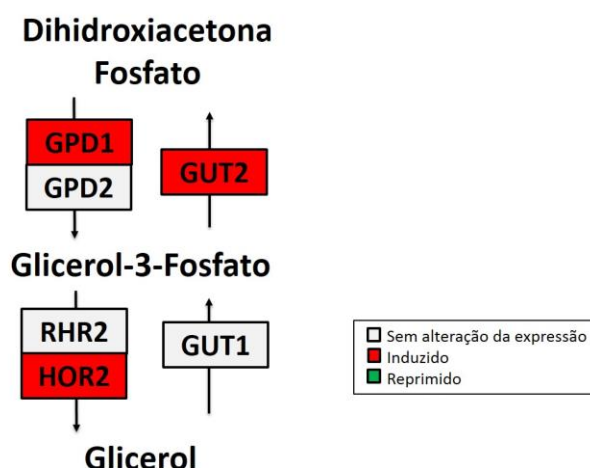


**Figura 13:** Gráfico do padrão de modificação da expressão gênica na cepa DBY9434 nos diferentes tratamentos descritos em Gash et al., 2000; de acordo com a classificação por cor: Laranja – Metabolismo Energético, Vermelho – Resposta a Estímulo Ambiental, Verde – Parede e Membrana Celular, Amarelo – Transporte de Membrana, Sinalização e Polaridade Celular, Roxo – Ciclo Celular e Morfogênese, Azul – Reparo, Conservação e Utilização de DNA e RNA, Cinza – Ubiquitinação e Branco – Outros, respectivamente. (a) Tratamento por alta temperatura (25 °C para 37 °C); (b) Tratamento por baixa temperatura (37 °C para 25 °C); (c) Tratamento oxidativo (0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e (d) Tratamento etílico (8% etanol).

#### 4.4 Estudo das modificações na expressão diferencial de genes envolvidos na classe de transporte de membrana, sinalização e polaridade celular nas cepas selvagens.

Bravim et al. (2010) nos aponta que cepas laboratoriais apresentam uma menor capacidade fermentativa do que cepas selvagens, apesar de serem mais tolerantes a HHP. Observamos, então, que as maiores discrepâncias entre as respostas das cepas selvagens e laboratorial quanto as modificações gênicas ocorrem na classe “transporte de membrana, sinalização e polaridade celular”. Desse modo inferimos que a maior tolerância de Y440 a HHP pode estar relacionada com essa classe.

Em observações de vias relacionadas a essa classe pode-se constatar uma indução do transportador de glicerol-3-fosfato, como mostrado na figura 14. Essa via é normalmente ativada quando *Saccharomyces* se encontra em condições anaeróbicas, pois o glicerol que é formado atua como um regulador do balanço redox na célula. Porém, como mencionado anteriormente, no estresse por HHP a via aeróbica está ativada, logo esperávamos observar outras vias de regulação induzidas.



**Figura 14:** Via metabólica do transportador de glicerol-3-fosfato ativada no estresse de alta pressão hidrostática.

O transportador de glicerol-3-fosfato é responsável por levar equivalentes reduzidos do meio citosólico para a membrana mitocondrial através da redução da ubiquinona em ubiquinol (SHEN et al., 2006).

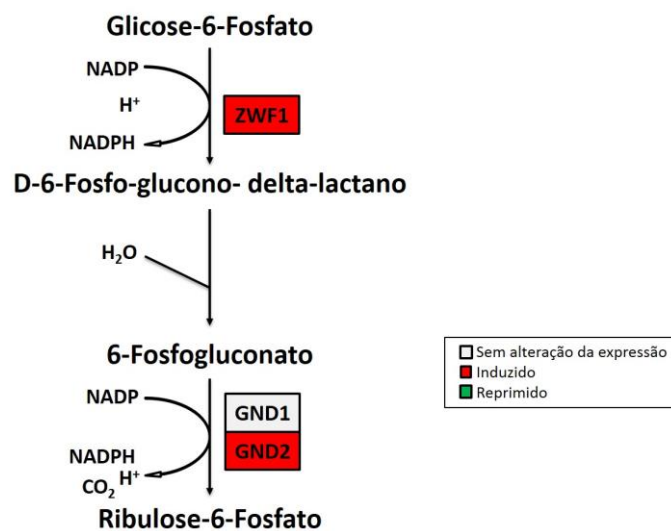
É interessante destacar que apenas GPD1 e GUT2 estão induzidas no processo, enquanto todo o restante da via de produção de glicerol não sofreu modificação em sua regulação, houve indução apenas do transportador de glicerol-3-fosfato. Porém como citado anteriormente em condições estressantes pode ocorrer o acúmulo de ROS na célula, visto que essas moléculas têm importante função na sinalização celular e no balanço redox (GHEZZI; BONETTO; FRATELLI, 2005; WU; CEDERBAUM, 2003).

Uma outra resposta encontrada foi a ativação da via das pentoses fosfato através da indução de ZWF1 e GND2. Esse fenômeno pode ser em resposta ao estresse oxidativo causado pela indução do transportador de glicerol-3-fosfato. Nessa via ocorre a formação de ribose-5-fosfato ou D-ribose e NADPH, como mostra a figura 15.

O NADPH é utilizado na redução da glutathione, importante composto na manutenção do estado de redox celular, atuando na detoxificação celular em presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Dessa forma ocorre a reciclagem do NADPH da via das pentoses e da glutathione.

Interessantemente a via de síntese de homocisteína, que culmina na produção de cisteína e metionina, também está ativada. Essa via apresenta a indução de MET3, MET6, MET10, MET14, MET16, MET17, quase todos os genes envolvidos. A cisteína é um aminoácido sulfurado que é utilizado como precursor de glutathione, porém a sua síntese não está ativada.

Imediatamente após a pressão MET6, responsável pela conversão da homocisteína em metionina, está ativado, indicando que esse aminoácido é requerido como resposta imediata ao estresse oxidativo. Concomitantemente, observamos MXR1, que codifica a metionina sulfóxido redutase, ativada, também atuando nessa resposta contra as ROS. E essa indução de MXR1 foi observada até hoje apenas resposta ao estresse oxidativo gerado por estresse por HHP.



**Figura 15:** Parte inicial da via da pentose fosfato ativada no estresse de HHP.

Dessa forma observamos que a classe selecionada para o estudo de fato se mostrou relevante para o estresse nas condições em que foram aplicadas, e principalmente se observa uma alteração no estado redox da célula devido à HHP, muito mais do que é causado em outros estresses relacionados.

## 5 CONCLUSÕES

Os dados demonstram que genes comuns às três cepas, ou relacionados às mesmas vias de resposta, apresentam um padrão de expressão gênica similar. Indicando um modelo de resposta ao estresse.

A diferença entre a ploidia das cepas BT0510 e BT0605 não se mostrou um fator relevante na resposta ao estresse, nem no processo de proteção cruzada, visto que as duas cepas apresentavam um padrão de resposta muito similar nos dois tratamentos aplicados.

A cepa piezotolerante Y440 demonstrou uma menor modificação na expressão gênica nos dois tratamentos realizados, mas também nos possibilitou a identificação de uma classe de estudo possivelmente responsável por essa tolerância.

Muitos trabalhos apontam a existência da tolerância adquirida após o pré-tratamento de células com HHP seguido de incubação a pressão ambiente. Em nosso trabalho mostramos a diferença numérica da expressão gênica que é causada por esse tempo de 15 minutos de recuperação que ocasionam justamente esse aumento da tolerância a estresses.

O tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido de incubação a pressão ambiente demonstrou, não apenas haver um maior número de genes com expressão modificada, mas também que nesse tratamento existe uma maior pressão de regulação sobre os genes modificados. Essa pode explicar o aumento da tolerância das cepas a outros estresses, e até mesmo a HHP.

Os estresses analisados demonstraram uma resposta similar com relação à regulação da expressão gênica geral, demonstrando diferenças significativas apenas na classe de transporte de membrana, sinalização e polarização celular.

Observou-se que genes incluídos nessa classe apresentam uma função de extrema importância na tolerância e resposta imediata ao estresse de HHP na cepa piezotolerante. Essa então se mostrou um alvo para maiores estudos com

o intuito de eleger genes para modificação das cepas, tornando-as mais tolerantes não só a esse estresse, mas também aos estresses comuns à fermentação.

Muitos trabalhos tratam a membrana e parede celular como alvos da HHP, porém não vimos grande diferença nessa classe quando comparado esse estresse com os outros analisados que apresentam diferentes alvos.

Observou-se que a HHP induz um estresse oxidativo na célula. Porém esses estresses não apresentaram uma correlação próxima quando observamos globalmente a modificação da expressão nas classes analisadas, se comparando com os outros estresses analisados.

Vias relacionadas a sinalização celular e balanço redox estão induzidas, total ou parcialmente, no estresse de HHP, como por exemplo a via das pentoses fosfato e a dos aminoácidos sulfurados como resposta a modificações causadas pelo estresse.

A indução do gene MXR1, que codifica a metionina sulfóxido redutase é um comportamento que se mostrou exclusivo do estresse de HHP. Esse está também relacionado à resposta ao estresse oxidativo gerado na célula pelo estresse.

As vias de sinalização e balanço no estado redox da célula se mostraram de extrema importância para resposta ao estresse de HHP. Algumas foram apontadas nesse trabalho, porém essas vias devem ser estudadas com maior profundidade para posterior criação de mais resistentes a HHP e possivelmente aos estresses fermentativos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; HORIKOSHI, K. Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (-piezo) physiology. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 223 - 228, 1997.

ABE, F.; HORIKOSHI, K. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 307 - 312, 1995.

ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 447 - 453, 1999.

AGazeta. **Cachaça do Espírito Santo é uma das melhores do Brasil mas o setor agoniza.** Disponível em: [http://gazetaonline.globo.com/index.php?id=/\\_templates/mobile-noticia.php&xml=/\\_conteudo/2014/09/noticias/cidades/1497194-cachaca-do-espirito-santo-e-uma-das-melhores-do-brasil-mas-setor-agoniza.html](http://gazetaonline.globo.com/index.php?id=/_templates/mobile-noticia.php&xml=/_conteudo/2014/09/noticias/cidades/1497194-cachaca-do-espirito-santo-e-uma-das-melhores-do-brasil-mas-setor-agoniza.html). Acesso em: 28 de jan de 2015.

AGUILERA, J.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 327 – 341, 2007.

ALEXANDRE, H. et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p. 98 - 103, 2001.

ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, I.; CHARPENTIER, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 124, p. 17 - 22, 1994.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89 - 105, 2009.

BARFORD, J. P.; HALL, R. J. An examination of the crabtree effects in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of respiratory adaptation. *Journal of Genetic Microbiological*, p. 3065 – 3069, 1979.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 8: Taxonomy. **Yeast**, v. 21, p. 1141 - 1193, 2004.

BECKER, J.; CRAIG, E. A. Heat shock proteins as molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, p. 11 - 23, 1994.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24261 - 24267, 2001.

BOY MARCOTTE, et al. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1044 - 1052, 1999.

BRAGANZA, L. F.; WORCESTER, D. L. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused hydrostatic pressure. **Biochemistry**, v. 25, p. 7484 - 7488, 1986.

BRAVIM, F. et al. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1071 - 1079, 2010.

BRAVIM, F. et al. High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2093 - 2107, 2013.

BRAVIM, F. Utilização da alta pressão hidrostática como ferramenta biotecnológica: Indução de resistência em levedura para a produção de cachaça. Vitória, 2011. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo.

CAMPOS, C. R. et al. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **The Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1871 - 1879, 2009.

Canaplan (Brasil). **Agronegócio brasileiro: Cana-de-açúcar**: Visão de curto prazo: safra 2015/16 a 2017/18. São Paulo, 2014. 10 p. Disponível em: <http://canaplan.com.br/escopo-detalhado.pdf>. Acesso em: 28 de jan de 2015.

CANETTA, E.; ADYA, A. K.; WALKER, G. M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, p. 308 - 319, 2006.

CARDOSO, D. R. et al. Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3429 - 3433, 2004.

CAUSTON, H. C. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 323 - 337, 2001.

COLIN, L. K.; NELSON, H. C. M. The natural osmolyte trehalose is a positive regulator of the heat-induced activity of yeast heat shock transcription factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 4, p. 1505 - 1515, 2007.

**Conab** – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. 2014.

CONCEIÇÃO, L. E. F. R. et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 237 - 246, 2015.



COOTE, P. J.; COLE, M. B.; JONES, M. V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1701 - 1708, 1991.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217 – 246, 2001.

CRAIG, E. A. The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Molecular and Cellular Biology of The Yeast *Saccharomyces*. **Gene Expression**, v. 2, p. 501 - 537, 1992.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein Carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23 – 38, 2003.

DAWES, I. W. Yeast stress response. The metabolism and physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ed CRC Press: **Boca Raton**. 2 ed, 2004.

DE DEKEN, R. H. The crabtree effect: A regulatory system in yeasts. **Journal of Genome Microbiology**, v. 44, p. 149 – 156, 1966.

DOMITROVIC, T. et al. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 580, p. 6033 - 6038, 2006.

ELO, M. A. et al. High hydrostatic pressure inhibits the biosynthesis of eukaryotic elongation factor-2. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2004.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469 - 486, 2000.

FARR, S. B.; KOGOMA, T. Oxidative Stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 561 – 585, 1991.

FELDMANN, H. (Editor). Yeast: Molecular and Cell Biology. Ed. Wiley-Blackwell: **Estados Unidos da América**. 2<sup>nd</sup> ed, 2012.

FERNANDES, P. M. B et al. Levedura: do pão à biotecnologia. Vitória, ES: **Edufes**, 2009.

FERNANDES, P. M. B. et al. Genome expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**, v. 556, n. 1, p. 153 – 160, 2004.

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 38, n. 8, p. 1239 – 1245, 2005.

FERNANDES, P. M. B., FARINA, M., KURTENBACH, E. Effects of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose

synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p.42 – 46, 2001.

FERNANDES, P. M. B.; PANEK, A. D.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p.17 – 21, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 9, n. 408, p. 239 - 247, 2000.

FOLCH-MALLOL, J. L. et al. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, p. 24 – 46, 2004.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 4241–4257, 2000.

GASCH, A. P. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). Yeast stress response. 2. Nd. **Springer**, p. 11-57, 2003

GAST, K. et al. Cold denaturation of yeast phosphoglycerate kinase: kinetics of changes in secondary structure and compactness on unfolding and refolding. **Biochemistry**, v. 32, p. 7747 – 7752, 1993.

GHEZZI, P.; BONETTO, V.; FRATELLI, M. Thiol-disulfite balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulations. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.7, p. 964 – 972, 2005.

GIBSON, B. R. et al. Yeast response to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology**, v. 31, p. 535 – 569, 2007.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546 – 549, 1996.

HALLIEWELL, B. Current status review: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. Journal Exp. Pathology*, v. 70, p. 737 – 757, 1989.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300 – 372, 2002.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. Introduction. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). Yeast stress response. 2nd. **Springer**, 2003.

HOMMA, T. et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am Journal Respir Cell Molecular Biology*, v. 31, p. 463 – 469, 2004.

HOTTIGER, T. et al. The 70-kilodalton heat-shock proteins of the SSA subfamily negatively modulate heat-shock-induced accumulation of trehalose

and promote recovery from heat stress in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 210, n. 1, p.125 – 32, 1992.

IGUAL, J. C.; ESTRUCH, F. Signalling stress in yeast. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 263 – 276, 2000.

INOUE, T. et al. Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 229 – 236, 2000.

INOUE, M. Cold-shock response and adaptation. **Bioassay**, v. 20, n. 1, p. 49 – 57, 1999.

IWAHASHI, H. et al. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiology Letters** v. 80, p. 325 – 328, 1991.

IWAHASHI, H. et al. Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 53 – 57, 1993.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511 – 1527, 1998.

JAMIESON, D. J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 6678 – 6681, 1992.

JUSTINO, M.; MUTTON, R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. Tecnologia de bebidas. **São Paulo**: Ed. Edgar Blucher, 2005.

KANDROR, O. et al. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2, 4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. **Molecular Cell**, v. 13, p. 771 – 781, 2004.

KILEY, P. J; STORZ, G. Exploiting thiol modifications. **Plos Biology**, v. 2; p. 1714 – 1717, 2004.

KIM, H.; KIM, N.; CHOI, W. Total fatty acid content of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is more responsible for ethanol tolerance than the degree of unsaturation. **Biotechnology Letters**, v.33, p.509 – 515, 2011.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE A. H., HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**.2. ed. Academic Press, p. 5 – 61, 1987.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. **São Paulo**: Ed. Sarvier, 2007.

LEWIS, J. G.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 687 – 694, 1995.

LOS, D. A.; MURATA, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1666, n. 1, p.142 – 157, 2004.

LYNCH, T. W.; SLIGAR, S. G. Experimental and theoretical high pressure strategies for investigating protein-nucleic acid assemblies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 277 – 282, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> Porto Alegre: Arned, 2010.

MARTIN, V.; QUAIN, D. E.; SMART, K. A. Brewing yeast oxidative stress responses: impact of brewery handling. **Brewing Yeast Fermentation**. 2 Ed Oxford: Blackwell Science, 2003.

MARTÍNEZ-PASTOR, M.T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response elemento (STRE). **EMBO**, v. 15, p. 2227 – 2235, 1996.

MARZA, E.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S. Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. **FEBS Letters**, v. 521, n. 1, p. 47 – 52, 2002.

MENTRÉ, P. et al. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. **Cellular and Molecular Biology**, v. 45, p. 353 – 362, 1999.

MENTRÉ, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule – associated water. **International Review of Cytology**, v. 201, p. 1 – 84, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio – **Brasil** 2012/13 – 2022/23. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/ampliacao-de-mercado-foi-um-dos-destaques-do-agronegocio-brasileiro-em-2014>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2015.

MOLINA-GARCIA, A. D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 19, p. 3 – 54, 2002.

MORADAS-FERREIRA, P. et al. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 651 – 658, 1996.

MURATA, Y. et al. Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4 °C. **Extremophiles**, v. 10, p. 117–128, 2006.

NASCIMENTO, L. S. B. O mutante *S. cerevisiae* em 5 factores de transcrição da família Yap. Dissertação (**Mestrado em Microbiologia Molecular**), Universidade de Aveiro. 2005.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 379 – 412, 2008.

ODANI, M. et al. Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. **Cryobiology**, v. 47, p. 155 – 164, 2003.

PALHANO, F. L.; ORLANDO, M. T. D.; FERNANDES, P. M. B. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 139 – 145, 2004.

PANADERO, J. et al. A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 4638 – 4645, 2006.

PARSELL, D. A.; KOWAL, A. S.; LINDQUIST, S. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. **Nature**, v. 372, p. 475 – 478, 1994.

PETERS, W. S.; HAGEMANN, W.; DERI TOMOS, A. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in 'soft' plant tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 151 – 167, 2000.

PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, p. 121 – 127, 1995.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat sock response and beyond. **FASEB Journal**, v. 15, n. 7, p. 1118 – 1131, 2001.

POCSI, I.; PRADE, R. A.; PENNINCKX, M. J. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. **Adv Microb Physiol**, v. 49, p. 1 – 76, 2004.

REYES, M. C.; TAUC, P.; BROCHON, J. C. Pressure effects on the physical properties of lipid bilayers detected by trans-parinaric acid fluorescence decay. **Biophysiology Journal**, v. 65, p. 2248 – 2260, 1993.

ROBINSON, C.R.; ENGELBORGH, Y. Tubulin polymerization in dimethyl sulfoxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 5367 – 5371, 1982.

RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolism. In Yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, p. 101 – 122, 2005. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6231/1/Ch06.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2012.

RODRÍGUEZ-VARGAS, S. et al. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 110 – 116, 2007.

ROMAN, H. Development of yeast as an experimental organism. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH J.R. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance. **Cold Spring Harbor Laborat Press**, 1981.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. The Yeast: biology of yeast. 2 ed. **Academic Press**, v. 2, 1987.

SAHARA, T.; GODA, T.; OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 50015 – 50021, 2002.

SALMON, E. D. Pressure- induced depolymerization of brain microtubules in vitro. **Science**, v. 189, p. 884 – 886, 1975.

SANTANCELO, G. M.; TORNOW, J. Efficient transcription of the glycolytic of the glycolysis gene ADH1 and three translational component genes requires the GCR1 product, which can act through TUF/GRF/RAP binding sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 2, p. 859 – 862, 1990.

SCHADE, B. et al. Cold adaptation in budding yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 5492 – 5502, 2004.

SCHEFFERS, W. A.; WIKÉN, T. O. The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. **Yeast Symposium**, v. 35, 1969.

SCHWANN, T. Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulniss. **Annual Physiological Chemistry**, v. 41, p. 184 – 193, 1837.

SHEN, W. et al. Involvement of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase in modulation the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, p. 422 – 441, 2006.

SHOBAYASHI, M. et al. Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 2381 – 2388, 2005.

SIDERIUS, M.; MAGER, W.H. General stress response: in search of a common denominator. In: **Yeast Stress Response**. Mager, W. M.; Hohmann, S., Eds.) p. 241 - 230. R.G. Company, Texas, USA, 1997.

SILVA, J. L.; FOGEL, D. Hydratation, cavities and volume in protein folding, aggregation and amyloid assembly. **Physiological Biology**, v. 6, n. 1, p. 150, 2009.

SILVA, J.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 612 – 618, 2001.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein Oxidation. **Annual NY Academy Science**, v. 899, p. 191 – 208, 2000.

STRASSBURG, K. et al. Dynamic transcriptional and metabolic responses in yeast adapting to temperature stress. **OMICS**, v. 14, n. 3, p. 249 – 259, 2010.

STUKEY, J. E.; MCDONOUGH, V. M.; MARTIN, C. E. Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 16537 – 16544, 1990.

THIERINGER, H. A.; JONES, P. G.; INOUE, M. Cold shock and adaptation. **Bioessays**, v. 20, p. 49 – 57, 1998.

TREVISOL, E. T. V. et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 697 – 704, 2011.

TROLLMO, C. et al. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, p. 321 – 326, 1988.

VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I.; ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **Int J Clin Res.**, v. 29, p. 49 – 55, 1999.

VOELMMY, R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 9, n. 2, p. 122 – 133, 2004.

WILDSMITH, S. E.; ELCOCK, F. J. Microarrays under the microscope. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 8 – 16, 2001.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane – solute –water systems. **Cryobiology**, v. 39, p. 103 – 129, 1999.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Alcohol Research Health**, v. 27, p. 277 – 284, 2003.

YAYANOS, A. A.; POLLARD, E. C. A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Biophysics**, v. 9, p. 1464 – 1482, 1969.

ZHU, H. et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. **Science**, v. 293, p. 2101 – 2105, 2001.

ZIMMERMAN, A. M. High pressure studies in cell biology. **International Review of Cytology**, v. 30, p. 1 – 47, 1971.